

10/516768

JP03/06641

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

28.05.03

03 DEC 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日
Date of Application:

2002年 6月 4日

REC'D 18 JUL 2003

出願番号
Application Number:

特願 2002-162797

WIPO PCT

[ST.10/C]:

[JP 2002-162797]

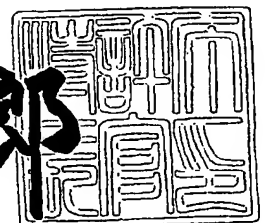
出願人
Applicant(s):科学技術振興事業団
国立循環器病センター総長

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 7月 3日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2003-3052659

【書類名】 特許願

【整理番号】 PA909444

【提出日】 平成14年 6月 4日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府寝屋川市大字高宮 6 5 2 - 3 3 5

 【氏名】 南野 直人

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府茨木市豊川 4 - 2 6 - 8 - 3 0 4

 【氏名】 片渕 剛

【特許出願人】

 【持分】 050/100

 【識別番号】 396020800

 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

 【代表者】 沖村 憲樹

【特許出願人】

 【持分】 050/100

 【識別番号】 591108880

 【氏名又は名称】 国立循環器病センター総長

【代理人】

 【識別番号】 100102668

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 佐伯 憲生

 【電話番号】 03-5205-2521

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 039251

 【納付金額】 10,500円

【その他】 国等以外の全ての者の持分の割合 50 / 100

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 cAMPの産生活性を有する新規ペプチド

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の(1)～(6)の性質、

(1) 中枢神経系において発現し、(2) カルシトニン受容体に強く作用し、
(3) 細胞のcAMP産生能を促進させ、(4) ナトリウムイオンを濃度依存的
に取り込む作用を有し、(5) カルシウムイオンの取り込みを抑制し、(6) 細胞増殖を抑制する作用を有するペプチド。

【請求項2】 少なくとも次ぎのアミノ酸配列、

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-	10
Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-	20
Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-	30
Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly-NH ₂	38

又はこれらのアミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加を受けたアミノ酸配列を有する請求項1に記載のペプチド。

【請求項3】 ペプチドが少なくとも配列表の配列番号1、配列番号2、配列番号6、配列番号9、配列番号12、配列番号16、若しくは配列番号19で示されるアミノ酸配列、又はこれらのアミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加を受けたアミノ酸配列を有する請求項1又は2に記載のペプチド。

【請求項4】 哺乳動物由来のペプチドである請求項1～3のいずれかに記載のペプチド。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかに記載のペプチドをコードする遺伝子。

【請求項6】 遺伝子が、配列表の配列番号3、配列番号7、配列番号10、配列番号13、配列番号17、又は配列番号20で示される塩基配列を有するものである請求項5に記載の遺伝子。

【請求項7】 請求項1～4のいずれかに記載のペプチド、及び製薬上許容される担体とからなる医薬組成物。

【請求項8】 医薬組成物が、骨粗鬆症の予防・治療剤、癌の予防・治療剤

、利尿剤、食欲抑制剤、又は鎮痛剤である請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】 医薬組成物が、降圧剤、又は P T C A（経皮的冠動脈形成術）後の再狭窄を防ぐための薬剤である請求項 7 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規かつ有用なペプチド、それをコードする遺伝子、及びそれを含有してなる医薬組成物に関する。より詳細には、本発明は、次の（１）～（１０）の性質、（１）中枢神経系において発現し、（２）カルシトニン受容体に強く作用し、（３）細胞の c A M P 産生能を促進させ、（４）ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む作用を有し、（５）カルシウムイオンの取り込みを抑制し、（６）細胞増殖を抑制する作用を有するペプチド、それをコードする遺伝子、及びそれを含有してなる医薬組成物に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

既知ペプチドであるカルシトニンは、３２個のアミノ酸からなるポリペプチドホルモンである。哺乳動物では甲状腺の C 細胞から分泌され、血液カルシウムを低下させる作用を有する。高カルシウム血症や代謝性骨疾患などの治療薬として利用されている。カルシトニンは、甲状腺など末梢系に存在するとされていて中枢神経系には発現していないとされていた。しかし、カルシトニン受容体は中枢神経系にも存在し、中枢神経系におけるカルシトニン受容体の存在意義や作用についての解明が求められていた。

また、カルシトニン遺伝子関連ペプチド（C G R P）はアミノ酸 37 個からなる蛋白質であり、カルシトニンと同じ遺伝子から転写された m R N A が、カルシトニンとは異なるスプライシングを受けて生成されるものである。カルシトニン遺伝子関連ペプチド（C G R P）は、カルシトニンと同様な血液カルシウム濃度を低下させる作用も有するが、カリウムイオンチャネルの活性化作用やアセチルコリン受容体の数を増加させる作用などもあり、神経伝達物質である可能性もあるとされている。

しかし、これらの蛋白質は中枢神経系のカルシトニン受容体に直接作用するものであると確認されておらず、中枢神経系のカルシトニン受容体に直接作用するペプチドの決定が求められていた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、中枢神経系に発現し、カルシトニン受容体に作用する新規かつ有用なペプチド、その遺伝子、及びそれを含有してなる医薬組成物を提供することを目的としている。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、中枢神経系から cAMP 産生を指標にして新規な生理活性ペプチドを探索してきた結果、カルシトニン受容体を介して細胞に作用すると考えられる新規なペプチドを単離、精製した。この構造は、データベース (Genbank, swissprot, DDBJ) の検索結果から新規配列であることが確認された。本発明者らはこの新規なペプチドがカルシトニン受容体に作用することからカルシトニン受容体刺激ペプチド (Calcitonin Receptor-Stimulating Peptide (CRSP)) と命名した。

【0005】

即ち、本発明は、次の (1) ~ (6) の性質、

(1) 中枢神経系において発現し、(2) カルシトニン受容体に強く作用し、(3) 細胞の cAMP 産生能を促進させ、(4) ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む作用を有し、(5) カルシウムイオンの取り込みを抑制し、(6) 細胞増殖を抑制する作用を有するペプチドに関する。より詳細には、本発明は少なくとも次ぎのアミノ酸配列、

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-	10
Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-	20
Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-	30
Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly-NH ₂	38

又はこれらのアミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加を受けたアミノ酸配

列を有する前記のペプチドに関する。より具体的には、配列表の配列番号 1、配列番号 2、配列番号 6、配列番号 9、配列番号 12、配列番号 16、若しくは配列番号 19 で示されるアミノ酸配列、又はこれらのアミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加を受けたアミノ酸配列を有する前記のペプチドに関する。

【 0 0 0 6 】

また、本発明のペプチドはカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) と相同性を有するペプチドを含むものであるから、CRSP の有する効果に加えて CGRP に類似した生理活性も期待できる場合がある。即ち、本発明のペプチドは、前記の (1) ~ (6) の性質に加えて、(7) カルシトニン関連ペプチド受容体に強く作用し、(8) 血管の弛緩作用を有し、(9) 利尿を促進させ、(10) 血管内皮細胞や血管平滑筋、線維芽細胞の増殖能を変化させる作用などの CGRP が有する作用と類似した作用を有することも期待される場合もある。

【 0 0 0 7 】

また、本発明は前記した本発明のペプチドをコードする塩基配列を有する遺伝子に関する。より詳細には、本発明は、遺伝子が、配列表の配列番号 3、配列番号 7、配列番号 10、配列番号 13、配列番号 17、若しくは配列番号 20 で示される塩基配列を有する前記した遺伝子に関する。

さらに、本発明は、前記した本発明のペプチド少なくとも 1 種、及び製薬上許容される担体からなる医薬組成物に関する。より詳細には、本発明は、医薬組成物が、骨粗鬆症の予防・治療剤、癌の予防・治療剤、利尿剤、食欲抑制剤、鎮痛剤、降圧剤、又は P T C A (経皮的冠動脈形成術) 後の再狭窄を防ぐための薬剤である前記した医薬組成物に関する。

【 0 0 0 8 】

本発明者らは、ブタ脳抽出液から腎臓上皮細胞の cAMP 産生を指標にして 2 種の新規な生理活性ペプチドを精製した。得られたペプチドのアミノ酸配列を解析したところ、

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-	10
Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-	20
Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-	30

Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly-NH₂ 38

という 38 個のアミノ酸からなるペプチド（以下、このペプチドを CRSP という。）と、その C 末端にさらにグリシンが結合した、

【 0 0 0 9 】

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His- 10

Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly- 20

Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr- 30

Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly-Gly-OH 39

という 39 個のアミノ酸からなるペプチド（以下、このペプチドを CRSP-Gly という。）であることがわかった。

そして、これらのペプチドのアミノ酸配列をデータベース（Genbank, swissprot, DDBJ）で検索したところ、いずれも新規なアミノ酸配列を有するものであることが確認された。

これらのアミノ酸配列を配列表の配列番号 1 及び 2 にそれぞれ示す。

【 0 0 1 0 】

得られたペプチドのアミノ酸配列に基づいて合成プライマーを作成し、ブタ遺伝子を鋳型に PCR 法で増幅することにより、目的の遺伝子をクローニングした。

用いたプライマーは、アミノ酸配列を基に N 末端側として、

TG(C/T)AA(C/T)AC(A/C/G/T)GC(A/C/G/T)AC(A/C/G/T)TG(C/T)ATGAC、及び、
C 末端側として、

CC(A/G)AA(A/C/G/T)AC(C/T)TT(A/G)AA(A/C/G/T)CCCATA

であった。

得られた遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号 3 に示し、それがコードしているアミノ酸配列を以下に示す。

【 0 0 1 1 】

Met-Gly-Phe-Trp-Lys-Phe-Pro-Pro-Phe-Leu- 10

Val-Leu-Ser-Ile-Leu-Val-Leu-Tyr-Gln-Ala- 20

Gly-Met-Phe-His-Thr-Ala-Pro-Met-Arg-Ser- 30

Ala-Phe-Gly-Ser-Pro-Phe-Asp-Pro-Ala-Thr-	40
Leu-Ser-Glu-Glu-Glu-Ser-Arg-Leu-Leu-Leu-	50
Ala-Ala-Met-Val-Asn-Asp-Tyr-Glu-Gln-Met-	60
Lys-Ala-Arg-Glu-Met-Gln-Lys-Gln-Arg-Ala-	70
Gln-Gly-Ser-Gly-Ile-Ser-Val-Gln-Lys-Arg-	80
<u>Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-</u>	90
<u>Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-</u>	100
<u>Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-</u>	110
<u>Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly-Gly-Arg-</u>	120
Arg-Arg-Asn-Phe-Trp-Ile	126

(式中、下線を引いた 81 番目～118 番目までが CRSP である。)

このアミノ酸配列を配列表の配列番号 4 に示す。

【0012】

ブタ CRSP をプローブにしてウシ及びイヌ甲状腺 cDNA ライブラリーから本発明のペプチドを得た。

ウシのアミノ酸配列は、アミノ酸の 1 文字コードで示すと、

ACNTATCMTHRLAGWLSRSG

SMVRSNLLPTKMGFKIFNGP-OH

である。これをアミノ酸の 3 文字コードで示すと次のようになる。

【0013】

Ala-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His- 10

Arg-Leu-Ala-Gly-Trp-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly- 20

Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr- 30

Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Ile-Phe-Asn-Gly-Pro-OH 40

【0014】

また、イヌのアミノ酸配列は、アミノ酸の 1 文字コードで示すと、

SCNSATCVAHWLGGLLSRAG

SVANTNLLPTSMGFKVYN-OH

である。これをアミノ酸の 3 文字コードで示すと次のようになる。

【0015】

Ser-Cys-Asn-Ser-Ala-Thr-Cys-Val-Ala-His-	10
Trp-Leu-Gly-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ala-Gly-	20
Ser-Val-Ala-Asn-Thr-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-	30
Ser-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Tyr-Asn-OH	38

【0016】

これらのアミノ酸配列、塩基配列、及び遺伝子がコードしている全アミノ酸配列をそれぞれ配列表に示す。

ウシの本発明のペプチドのアミノ酸配列を配列表の配列番号6に示し、その遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号7に示し、その遺伝子に基づくペプチドのアミノ酸配列を配列番号8にそれぞれ示す。

また、イヌの本発明のペプチドのアミノ酸配列を配列表の配列番号9に示し、その遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号10に示し、その遺伝子に基づくペプチドのアミノ酸配列を配列番号11にそれぞれ示す。

【0017】

ブタCRSPのコード領域全長をプローブとして、ブタ遺伝子ライブラリーよりCRSPと相同性を有するペプチドをコードする遺伝子を得た。この遺伝子の産物であるペプチドをそれぞれ、CRSP-2、CRSP-3と名付けた。

また、同様にして、ブタカルシトニン(CT)と相同性を持つペプチドをコードする遺伝子を得た。この遺伝子の産物であるペプチドをCT-2と名付けた。

CRSP-2のアミノ酸配列は、アミノ酸の3文字コードで示すと次のようになる。

【0018】

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Ser-Cys-Val-Thr-His-	10
Lys-Met-Thr-Gly-Trp-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-	20
Ser-Val-Ala-Lys-Asn-Asn-Phe-Met-Pro-Thr-	30
Asn-Val-Asp-Ser-Lys-Ile-Leu-NH ₂	37

【0019】

CRSP-3のアミノ酸配列は、アミノ酸の3文字コードで示すと次のように

なる。

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Ile-Cys-Val-Thr-His-	10
Lys-Met-Ala-Gly-Trp-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-	20
Ser-Val-Val-Lys-Asn-Asn-Phe-Met-Pro-Ile-	30
Asn-Met-Gly-Ser-Lys-Val-Leu-NH ₂	37

【0020】

CT-2のアミノ酸配列は、アミノ酸の3文字コードで示すと次のようになる

Glu-Cys-Asn-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-	10
Gly-Thr-Tyr-Thr-Trp-Asp-Val-Asn-Lys-Phe-	20
Tyr-Ala-Phe-Pro-Leu-Thr-Thr-Thr-Gly-Ile-	30
Arg-Val-Ser-NH ₂	33

【0021】

CRSP-2のアミノ酸配列を後記配列表の配列番号12に示し、そのcDNAの塩基配列を配列番号13に、そのcDNAに基づくペプチド（前駆体ペプチド）のアミノ酸配列を配列番号14にそれぞれ示す。また、CRSP-2遺伝子の塩基配列を配列番号15に示す。

CRSP-3のアミノ酸配列を配列表の配列番号16に示し、そのcDNAの塩基配列を配列番号17に、そのcDNAに基づくペプチド（前駆体ペプチド）のアミノ酸配列を配列番号18にそれぞれ示す。

CT-2のアミノ酸配列を配列表の配列番号19に示し、そのcDNAの塩基配列を配列番号20に、そのcDNAに基づくペプチド（前駆体ペプチド）のアミノ酸配列を配列番号21にそれぞれ示す。また、CRSP-3遺伝子及びCT-2遺伝子の塩基配列を配列番号22に示す。

【0022】

図1に本発明のペプチドの例としてブタCRSPの構造を模式的に示す。この例のペプチドの場合は、2番目のCysと7番目のCysが-S-S-結合している。

また、図2に、本発明のブタCRSP（pCRSP）、ブタカルシトニン遺伝

子関連ペプチド (pCGRP-I)、ヒトカルシトニン遺伝子関連ペプチド I (hCGRP-I)、ヒトカルシトニン遺伝子関連ペプチド II (hCGRP-II)、ヒトアミリン (hAmylin)、ブタカルシトニン (pCT)、及びヒトアドレノメデュリン (hAM) のアミノ酸配列を比較したものを示す。

本発明の、CRSP はブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド (pCGRP) と 71.1%、ヒトCGRP-I と 63.2%、ヒトCGRP-II と 71.1% とそれぞれアミノ酸配列上の相同性を有している。

また、ブタ由来のペプチドについて、各CRSPとCRGPやAM、CT-2 とCTのアミノ酸の比較を行ったものを図23に示す。

【0023】

次にCRSPの発現部位を調べるためにノーザンブロッティングを行った結果を図3に図面に代わる写真で示す。図3中の矢印は、CRSP mRNA の位置を示している。また、各組織のペプチドの含有量をCRSPの抗体を用いてラジオイムノアッセイにより測定した。この測定結果を次の表1に示す。

【0024】

【表 1】

ラジオイムノアッセイで測定したCRSP の組織含量

組織	CRSP の免疫活性 (pmol/g 組織)		
大脳皮質	0.29	±	0.04
小脳	0.18	±	0.02
中脳	7.5	±	0.9
海馬	0.78	±	0.16
尾状核	1.3	±	0.1
視床	3.5	±	0.4
視床下部	9.9	±	1.2
橋・延髄	2.2	±	0.3
脊髄	0.52	±	0.06
嗅球	0.74	±	0.22
下垂体前葉	14	±	2
下垂体後葉	96	±	15
肺	0.11	±	0.00
副腎	0.42	±	0.05
腎臓・皮質	0.12	±	0.01
腎臓・髄質	0.088	±	0.039
肝臓	0.13	±	0.02
脾臓	0.11	±	0.01
胃	0.29	±	0.00
小腸	0.072	±	0.018
膵臓	0.066	±	0.010
甲状腺	68	±	39
卵巣	0.18	±	0.09
心房	0.20	±	0.04
心室	0.21	±	0.09
大動脈	0.33	±	0.19

各数値は平均値 ± 標準誤差 (n=3)を表す

【0025】

この結果、本発明のCRSPは、中枢神経系においては中脳、視床下部に、末梢においては甲状腺に多くの遺伝子発現がみられた。また橋・延髄にも中程度の発現が見られ、大脳、下垂体においても僅かではあるが発現が観察される。一方組織含量は下垂体後葉、甲状腺が最も多く、中脳、視床下部、下垂体前葉にも高

い組織含量が観察された。

【0026】

次に、CRSPの生理活性について検討した。

まず、LLC-PK₁細胞を用いてCRSPのcAMP産生活性を検討した。LLC-PK₁細胞の培地にDMEMに溶解したCRSPを添加して、分泌されてきたcAMPの量をcAMP特異的な抗体を用いたラジオイムノアッセイにより定量した。結果を図4に示す。図4の縦軸はcAMPの産生量(pmol/10⁵細胞/30分)を示し、横軸は各ペプチドの濃度の逆対数(-log(ペプチド濃度(M)))を示す。図4の黒丸(●)は本発明のCRSPを示し、白丸(○)はブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド(pigCGRP)を示し、白菱形(◇)はブタカルシトニン(pigCT)をそれぞれ示す。この結果、本発明のCRSPは、ブタ腎上皮細胞由来のLLC-PK₁細胞の細胞内アデニル酸シクラーゼ活性を濃度依存的に非常に強く(ED₅₀は約1.5nM)上昇させる。この活性はブタカルシトニン(ED₅₀は約8.7nM)より約6倍、ブタCGRP(ED₅₀は約62nM)より約40倍強かった。

【0027】

次に本発明のCRSPのナトリウムイオン、カルシウムイオンの取り込みの促進作用を検討した。

LLC-PK₁細胞の培養液をハंकスー塩化コリン液に置換し、一定量の放射活性をもつ塩化ナトリウム(²²Na)及びCRSPをそれぞれ終濃度0M、10⁻⁸M、10⁻⁷M、10⁻⁶Mになるように添加し、10分後、細胞を洗浄して細胞外液に含まれる²²Naを完全に除去し、細胞内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定した。また同様にLLC-PK₁細胞の培養液をハंकスー塩化コリン液に置換し、一定量の放射活性を持つ塩化ナトリウム(²²Na)及びそれぞれCRSPとNa/H共輸送体阻害剤であるアミロライド誘導体5-(N-エチル-N-イソプロピル)-アミロライド(5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride(EIPA))を終濃度CRSP 0M+EIPA 0M、CRSP 10⁻⁶M+EIPA 0M、CRSP 10⁻⁶M+EIPA 10⁻⁸M、CRSP 10⁻⁶M+EIPA 10⁻⁷M、CRSP 10⁻⁶M

+EIPA 10^{-6} M、CRSP 0M+EIPA 10^{-6} Mとなるよう添加し、10分後、細胞を洗浄して細胞外液に含まれる ^{22}Na を完全に除去し、細胞内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定した。

結果を図5 (EIPA非存在下でのナトリウムイオンの取り込み)、図6 (EIPA存在下でのナトリウムイオンの取り込み)、及び図7 (カルシウムイオンの取り込み) にそれぞれ示す。図5、図6及び図7の縦軸は各イオンの取り込み量 (cpm) を示し、横軸に左端はコントロール (ペプチド無添加) を示し、その右は各濃度のCRSPを示す。図6の横軸のコントロールの右はCRSP単独投与の場合を示し、その右はCRSPとEIPAの共投与の各濃度を示し、右端はEIPA単独投与の場合を示す。図7中のsCTは、サケカルシトニンを示す。図5、図6、及び図7中、*印は $p < 0.05$ で、**印は $p < 0.01$ で、***印は $p < 0.001$ で有意差があったことを示す。

この結果、CRSPはLLC-PK₁細胞上のアミロライド感受性Na/H共輸送体を活性化して細胞内へのナトリウムの取り込みを促進する。また細胞内へのカルシウムの取り込みを抑制することがわかった。

【0028】

次にCRSPによる細胞増殖の抑制作用について検討した。

LLC-PK₁細胞に各濃度の各ペプチドのDMEM溶液を添加し、 ^{125}I で標識したプロモデオキシウリジンを含むDMEM (0.1% BSAを含む) を各ウェルに添加して、5時間後核内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定し、細胞増殖に伴って合成されたDNA量を測定した。結果を図8に示す。図8の縦軸は ^{125}I -DUの取り込み量 ($\times 100 \text{ cpm/ウェル}$) を示し、横軸は各ペプチドの濃度の逆対数 ($-10g(\text{ペプチド濃度(M)})$) を示す。図8の黒丸 (●) は本発明のCRSPを示し、白丸 (○) はブタカルシトニン (ブタCT) を示し、白菱形 (◇) はサケカルシトニン (サケCT) をそれぞれ示す。

また、細胞の増殖数は、10,000細胞/ウェルのLLC-PK₁細胞に各濃度のCRSPのDMEM溶液を添加し、培養後、培養皿上の細胞をトリプシン-EDTA溶液で剥がし、細胞数を計数板にて計測した。結果を図9に示す。図9の

縦軸は細胞数 ($\times 1,000$ 細胞/ウェル) を示し、横軸は左端はコントロール (CRSP 無添加) を示し、その右は各濃度の CRSP を示す。* 印は $p < 0.05$ で有意差があったことを示す。

これらの結果、CRSP は LLC-PK₁ 細胞の増殖を抑制する作用を有することがわかった。

【0029】

次に、本発明の CRSP によるカルシトニン受容体への作用を検討した。

ブタカルシトニン受容体 (CTR) を哺乳類発現ベクター p cDNA3.1 に導入し、アカゲザル腎細胞 (COS-7) に発現させて CRSP 刺激による cAMP 産生量をラジオイムノアッセイにより測定した。同様にオポッサム腎細胞 (OK 細胞) に CTR を発現させて CRSP 刺激による cAMP 産生量をラジオイムノアッセイ法により、ナトリウムイオンの取り込みを放射活性を持つ塩化ナトリウム (^{22}Na) の取り込みをガンマカウンターで計測することにより測定した。結果を図 10 (遺伝子工学的にカルシトニン受容体を発現している細胞 (COS-7) の CRSP 刺激による cAMP 産生能の変化)、図 11 (ブタカルシトニン受容体 (CTR) を発現させたオポッサム腎上皮細胞の cAMP 産生能の変化)、及び図 12 (ブタカルシトニン受容体 (CTR) を発現させたオポッサム腎上皮細胞のナトリウムイオンの取り込みの変化) に示す。

図 10 の縦軸は cAMP の産生量 (pmol/ウェル/30 分) を示し、横軸は各ペプチド (リガンド) の濃度の逆対数 ($-\log(\text{リガンド濃度(M)})$) を示す。図 10 の黒丸 (●) は本発明の CRSP を示し、白菱形 (◇) はブタカルシトニン (pCT) をそれぞれ示す。図 11 の縦軸は cAMP の産生量 (fmol/ウェル/1 時間) を示し、横軸は CRSP の濃度の逆対数 ($-\log(\text{CRSP 濃度(M)})$) を示す。図 11 の黒丸 (●) はブタカルシトニン受容体 (CTR) を導入したオポッサム腎上皮細胞の場合を示し、黒四角 (■) はオポッサム腎上皮細胞 (OK 細胞) の場合を示す。図 12 の縦軸はナトリウムイオンの取り込み量の比 (コントロールを 100 とする) を示し、横軸は CRSP の濃度の逆対数 ($-\log(\text{CRSP 濃度(M)})$) を示す。図 12 の黒丸 (●) はブタカルシトニン受容体 (CTR) を導入したオポッサム腎上皮細胞の場合を示し、

黒四角 (■) はオポッサム腎上皮細胞 (OK細胞) の場合を示す。図12において、***印は $p < 0.001$ で有意差があったことを示す。

この結果、CTRをCOS-7に発現させてCRSPで刺激すると、細胞内アデニル酸シクラーゼ活性が上昇 (ED_{50} は約 0.2 nM) する。この活性はブタカルシトニン (ED_{50} は約 71 nM) より約350倍強かった。CRSPのこの作用はブタのカルシトニンより約350倍も強力で、既知の生理活性ペプチドの中で最も強いものである。同様にオポッサム腎上皮細胞 (OK細胞) にCTRを発現させてCRSPで刺激すると、細胞内アデニル酸シクラーゼ活性が上昇すると同時にアミロライド感受性 Na^+/H 共輸送体を活性化して細胞内へのナトリウムの取り込みを促進する効果が観察された。

【0030】

さらに、CRSPのラットの血圧及び血漿中イオン濃度の変化について検討した。

生理食塩水に溶解した 16 nmol/kg に相当する量のCRSPを麻酔条件下でラット頸静脈より短期間に一度に投与して、血漿中カルシウム濃度及び血圧を測定した。結果を図13 (CRSP投与による血中カルシウム濃度の変化) 及び図14 (CRSP投与による血圧の変化) に示す。図13の縦軸は血中カルシウム濃度 (mM) を示し、横軸は時間 (分) を示す。図14の縦軸は血圧 (mmHg) を示し、横軸は時間 (分) を示す。図13中の**印は $p < 0.01$ で有意差があったことを示す。

この結果、CRSPの投与により、一過性に血漿中カルシウム濃度が低下するが、一方血圧に対しては明確な変動を及ぼさないことがわかった。

【0031】

続いて、CRSPとCRSP-GlyのcAMP産生促進活性の違いについて検討した。

ブタカルシトニン受容体 (CTR) を哺乳類発現ベクターpcDNA3.1に導入し、アカゲザル腎細胞 (COS-7) に発現させてCRSP刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイにより測定した。結果を図15に示す。

この結果、CRSPとCRSP-Glyはほぼ同等のcAMP産生活性を有す

ることがわかった。

【0032】

また、ウシ及びイヌから単離してきた本発明のペプチド（ウシCRSP及びイヌCRSP）について、前記したのと同様にしてLLC-PK₁細胞を用いたCRSPのcAMP産生活性を検討した。結果を図16に示す。図16の縦軸はcAMPの産生量（pmol/ウェル/10分）を示し、横軸は添加したCRSPの濃度を示す。

この結果、ウシやイヌのCRSPでもブタCRSPの場合とほぼ同様な結果が得られることがわかった。

【0033】

本発明のペプチドの各種、CRSP、CRSP-2、CRSP-3、CT-2、CT、CGRP、GAPDHの遺伝子発現量をRT-PCRによる高感度定量により測定した。その結果を図24に示す。

CRSP-2及びCRSP-3は中枢及び甲状腺、卵巣に発現が観察された。一方CT-2は何れの組織でもバンドが増幅されず、発現が観察されなかった。CT-2は図24に示された組織以外に局限して発現しているものと考えられる。

【0034】

以上のように、本発明のペプチドは、カルシトニンより強くカルシトニン受容体を刺激し、アデニル酸シクラーゼを活性化することが示された。このことは、本発明のペプチドがカルシトニン受容体の真の内因性のリガンドであることを示している。

従って、本発明のペプチドは、末梢の組織のカルシトニン受容体に作用して以下のような薬効を奏するものと考えられる。

カルシトニンはその受容体であるカルシトニン受容体を介して骨へのカルシウムの取り込みを促進させる。本発明のペプチドはカルシトニンと同様にカルシトニン受容体に作用して骨へのカルシウムの取り込みを促進させると考えられる。実際に図13で示したようにラットにおいてこのペプチドの投与により、血漿中のカルシウム濃度の減少が観察された。この結果は骨へのカルシウムの取り込み

の促進を裏付けていると考えられる。この作用を利用して骨粗鬆症により低下した骨密度を健常状態に回復させるための薬剤として利用が可能であり、骨粗鬆症の予防・治療剤として使用することができる。

また図13に示されるように、本ペプチドは、血漿中のカルシウム濃度を低下させる活性を持っており、アルカローシス等に伴う高カルシウム血症の血漿中カルシウム濃度を通常レベルにまで下げるための薬剤への応用が可能であり、高カルシウム血症の治療・予防剤として使用することができる。

本ペプチドは、腎上皮細胞のアミロライド感受性Na/H共輸送体の作用を活性化する。これはカリウム保持性の利尿剤であるアミロライドの反対方向の活性であり、抗利尿剤として使用できる。

本発明のペプチドは、図8及び図9で示したようにカルシトニン受容体を介して腎上皮細胞の増殖を強く抑制する。カルシトニンはカルシトニン受容体を介して腺ガン細胞等の増殖を強く抑制する事が報告されている(Cancer Res. 1985, 45, 4890-4894 他)ため、同様に本発明のペプチドもカルシトニン受容体を介してこれらのガン細胞の増殖をカルシトニンよりも強力に抑制すると考えられ、ガンの治療、予防薬として使用できる。

【0035】

本発明のペプチドは、中枢に大量に発現していることが示された。従来から知られてきたアゴニストであるカルシトニンは中枢における発現が認められず、一方カルシトニン受容体は中枢に発現しているため、この事は本発明のペプチドが中枢における真の内因性リガンドであることを示している。カルシトニンを脳室内に投与すると、食欲の抑制、鎮痛作用を示すことが報告されている。カルシトニンは脳内に発現していないため、本ペプチドが脳内でこれらの作用を担っているものと考えられる。

したがって、本発明のペプチドは、中枢神経系のカルシトニン受容体に作用して以下のような薬効を奏するものと考えられる。

カルシトニンは中枢神経系で食欲の抑制に働いていることが報告されている(Science 1979, 206, 850-852, THE BONE 1992, 6, 69-74 他)。カルシトニン受容体をカルシトニンよりも強く活性化することができる本発明のペプチドは強い食欲

抑制作用を示す可能性が強い。本発明のペプチドの投与により肥満及びそれに伴う疾患（高血圧、高脂血症等）の治療・予防薬として使用することができる。

さらに、従来よりカルシトニン製剤がガンの転移や骨粗鬆症等による骨の痛み、偏頭痛、肺炎による痛み等に対し鎮痛作用を示すことが報告されている（Am. J. Med. Sci. 1997, 313, 13-16 他）。カルシトニン受容体をカルシトニンよりも強く活性化する本発明のペプチドは、カルシトニンと同様に強い鎮痛作用を示す可能性が高く、これらの痛みに対する鎮痛剤として有効性を有する。

【 0 0 3 6 】

本発明のペプチドは、（１）中枢神経系において発現し、（２）カルシトニン受容体に強く作用し、（３）細胞の c A M P 産生能を促進させ、（４）ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む作用を有し、（５）カルシウムイオンの取り込みを抑制し、（６）細胞増殖を抑制する作用を有することを特徴とするものである。これらの作用を有するペプチドであれば、前記したアミノ酸配列を有するものに限定されないが、カルシトニンやカルシトニン遺伝子関連ペプチドのアミノ酸配列と 5 0 % 以上、好ましくは 6 0 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるペプチドが好ましい。前記した例ではブタからの本発明のペプチドである C R S P を示してきたが、本発明のペプチドはブタ由来のものに限定されるものではなく、ヒト、ラット、イヌ、ウシなどの哺乳動物、サケなどの魚類動物などに由来するペプチドを包含している。

本発明のペプチドは、天然から抽出などの操作により、分離精製することもできる。また、通常のペプチド合成法により合成することもできる。さらに、本発明の遺伝子を適当なベクターに組み込んで、原核細胞や真核細胞を宿主細胞として遺伝子組換え技術により製造することもできる。

【 0 0 3 7 】

本発明の医薬組成物は、本発明のペプチドと製薬上許容される担体からなるものである。本発明の医薬組成物は、非経口投与又は経口投与することができ、好ましくは静脈投与、筋肉投与などの非経口投与される。

本発明の医薬組成物は、注射用製剤、凍結乾燥製剤、直腸投与製剤などに製剤化することができる。また、貼付デバイス、軟膏、貼付剤などの外用剤として製

剤化することもできる。さらに、舌下錠として製剤化することもできる。製剤化は通常のペプチド製剤の方法により行うことができる。

本発明の医薬組成物は、有効成分として本発明のペプチドのほかに他の有効成分を組み合わせ使用することもできる。本発明の医薬組成物の投与量としては、有効成分の本発明のペプチドの量として、通常は1日、体重あたり $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $1000 \text{mg}/\text{kg}$ 、好ましくは $0.1 \text{mg}/\text{kg}$ ～ $500 \text{mg}/\text{kg}$ の範囲で投与することができるが、患者の性状や疾患の症状に応じて適宜変更することができる。本発明のペプチドは、カルシトニンよりも強くカルシトニン受容体に作用するものであることから、従来のカルシトニン製剤と同様に疾患に適用することもできる。

【0038】

本発明のペプチドはまた、カルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）に相同性を有するペプチドも含まれるため、上記に記載した目的で利用できるのみならず、CGRPに類似した生理活性を利用することが可能である。

CGRPの生理活性としては、CGRP受容体に強く作用し、細胞内のcAMP産生を促進させる作用が知られている。また、CGRPは血管の弛緩作用を揺ること（Regul Pept. 1986, 15, 1-23等）、利尿を促進させること（Proc Soc Exp Biol Med 1998, 188, 316-322等）、血管内皮細胞や血管平滑筋、線維芽細胞などの細胞の増殖能を変化させること（Proc Natl Acad Sci USA.1990, 87, 3299-3303; Regul Pept 2001, 101, 169-178等）が報告されている。

【0039】

したがって、本発明のペプチドのなかのある種のもの、特にCGRPとの相同性の高いペプチドについては、（1）中枢神経系において発現し、（2）カルシトニン受容体に強く作用し、（3）細胞のcAMP産生能を促進させ、（4）ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む作用を有し、（5）カルシウムイオンの取り込みを抑制し、（6）細胞増殖を抑制する作用を有する、ことに加え、（7）カルシトニン関連ペプチド受容体に強く作用し、（8）血管の弛緩作用を有し、（9）利尿を促進させ、（10）血管内皮細胞や血管平滑筋、線維芽細胞の増殖能を変化させる作用などのCGRPが有する作用と類似する作用も合わせ持つ

ものであることが期待されるが、必ずしも本発明のペプチドのすべてが（７）～（１０）に示される作用を有するものではない。

このようなCGRPの有する作用に基づけば、本発明のペプチドを含む医薬組成物は、前記した本発明の医薬組成物の使用法の他に次の目的に使用する製剤として利用可能である。すなわち、血管の弛緩作用を直接利用した降圧剤、中枢及び末梢神経系を介した血管弛緩作用を利用した降圧剤、利尿剤、血管平滑筋の増殖の抑制を利用したPTCA（経皮的冠動脈形成術）後の再狭窄を防ぐための薬剤などとしても使用できる可能性がある。

【0040】

【実施例】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

【0041】

実施例1 （CRSPペプチドの抽出、単離）

ブタ脳20kgを4倍量の水中で10分間煮沸し、冷却後、最終的に1Mになるよう酢酸を添加してホモジェナイズし、遠心分離で不溶物を除去してブタ脳抽出液を作成した。これを限外濾過（ペリコンカセットPLAC #000-05, ミリポア社）で脱塩し、脱塩後の抽出液に氷冷下、終濃度66%になるようにアセトンをゆっくり加えた。沈殿を遠心分離により除去し、上清をエバポレーターによりアセトンを除去した後、逆相のカラム（LC-SORB SPW-C-ODS、ケムコ、1.5 l）に吸着させた。カラムを3倍量の0.5M酢酸で洗浄した後、3倍量の溶出バッファー（水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸＝40：60：1）でペプチド画分を溶出した。溶出液はエバポレーターによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥した。

凍結乾燥標品は秤量後1M酢酸に溶解し、陽イオン交換樹脂（SP-Sephadex、ファルマシア社、3×28 cm）の充填されたオープンカラムに吸着させ、素通り画分（SP-I）、2Mピリジン（pH8.0）で溶出された溶出画分（SP-II）、2Mピリジン-酢酸（pH5.0）で溶出された画分（SP-III）に分画し、SP-III強イオン性画分を得た。この画分を凍結乾燥した後1M酢酸に

溶解し、ゲル濾過（Sephadex G-50、ファルマシア社、7.5×145 cm、1 M酢酸、流速 100 ml/h）で分子量に応じてフラクションに分画し、分子量 1 kDa から 5 kDa に相当する部分を集めた。これを再びゲル濾過（Sephadex G-25、ファルマシア社、7.5×145 cm、1 M酢酸、流速 100 ml/h）で、分子量に応じた画分に分離し、分子量 2 kDa から 4 kDa に相当する部分を集め、凍結乾燥した。

【0042】

凍結乾燥標品をイオン交換クロマトグラフィー（CM52、Whatman社、2.4×45 cm、A液：10 mMギ酸アンモニウム（pH 6.5）：アセトニトリル＝9：1、B液：1 Mギ酸アンモニウム（pH 6.5）：アセトニトリル＝9：1、流速 35 ml/h）を用いて、10 mMから 0.5 Mまでギ酸アンモニウムによる濃度勾配溶出を行った。

ここで各画分の 1/1000 量を凍結乾燥し、凍結乾燥標品をダルベッコ改変イーグル培地（DMEM、0.05%牛血清アルブミンを含む）に溶解した培地でブタ腎臓由来の上皮細胞 LLC-PK₁ を刺激して 37℃ 1 時間インキュベーションし、培地に分泌される cAMP 量をラジオイムノアッセイにより定量した。

方法は未知量の cAMP を含む培地及び既知濃度の cAMP を含む培地 100 μl に、4% になるように無水コハク酸を溶解したジオキサントリエチルアミン混合液（ジオキサン：トリエチルアミン＝4：1）を等量加え、30 分間室温で放置して cAMP をサクシニル化し、遠心エバポレーターで乾固した後、1 ml の緩衝液（50 mM酢酸ナトリウム（pH 6.2）、1 mM EDTA、0.025% アジ化ナトリウム、0.5% 血清アルブミン、0.01% Triton X-100）に溶解し、その内 100 μl ずつを試験管に取り分け、50 μl ずつ放射性標識したサクシニル化 cAMP 及び抗体を加え、4℃ で 48 時間放置した。次に 100 μl の 1% γ-グロブリン及び 500 μl の 25% ポリエチレングリコールを添加してよく混和し、遠心分離を行って沈殿の放射活性をガンマカウンターを用いて測定し、既知濃度の cAMP により作成した標準曲線の放射活性と比較することで cAMP 量を定量した。

cAMP量の上昇が観察された画分（ギ酸アンモニウム（pH 6.5）約0.3M）をさらに陽イオン交換HPLC（TSK-gel CM-2SW、東ソー、7.8×300mm、A液：10mM ギ酸アンモニウム（pH 3.8）：アセトニトリル=9：1、B液：1Mギ酸アンモニウム（pH 3.8）：アセトニトリル=9：1、流速2ml/min）でギ酸アンモニウムの濃度勾配溶出を行った。再びそれぞれの画分の1/1000量を取り、活性を測定し、活性の観察された画分（ギ酸アンモニウム（pH 3.8）約0.36M）を、さらに逆相HPLC（C₁₈ 218TP54、Vydac社、4.6×250mm、A液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸=90：10：1、B液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸=40：60：1、流速1ml/min）でアセトニトリルによる濃度勾配溶出を行い、活性を持つ画分（アセトニトリル約32%）を得た。これを再び逆相HPLC（diphenyl 219TP5215、Vydac社、2.1×150mm、A液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸=90：10：1、B液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸=40：60：1、流速0.2ml/min）にて分離し、（アセトニトリル約29%）最終的な精製標品を得た。

約50 pmolのペプチドが得られた。このペプチドの分子量は4099で理論上の等電点は12.81と算出された。また上述の通りVydac社のC₁₈カラム（4.6×250mm、218TP54）で0.1%TFA存在下、アセトニトリル濃度約32%で溶出される程度の疎水性を持っていた。

【0043】

実施例2 （CRSPのアミノ酸配列の決定）

アミノ酸配列はエドマン法による自動アミノ酸シーケンサーを用いて決定した。まず、5 pmolの精製標品をN末端からアミノ酸シーケンサーを用いて解析し、Ser-Xaa-Asn-Thr-Ala-Thr-Xaa-Met-Thr-His-Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-

Arg-Ser-Gly-Ser-Met-Valを決定した。次に10 pmolの精製標品をトリプシン分解し、逆相HPLC（C₁₈ 218TP5215、Vydac社、2.1×150mm、A液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸=90：

10 : 1、B液 : 水 : アセトニトリル : 10%トリフルオロ酢酸 = 40 : 60 :

1、流速 0.2 ml/min) でアセトニトリルによる濃度勾配溶出を行った。

得られたピークをアミノ酸シーケンサーで解析し、

Ser-Xaa-Asn-Thr-Ala-Thr-Xaa-Met-Thr-His-Arg、

Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg、

Ser-Gly-Ser-Met-Val-Arg、

Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-Lys、

Met-Gly-Phe-Lys、

Val-Phe

の6個のシーケンスを得ることができた。これらの配列とデータベースとの比較から本ペプチドがカルシトニン遺伝子関連ペプチドと相同性を持ち、このペプチドが

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-

Arg-Ser-Gly-Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-Lys-Met-Gly-Phe-

Lys-Val-Phe-NH₂

という配列であると考えられた。

【0044】

一方、質量分析計により分子量を測定したところ、4130.6 ± 0.7 Da という結果が得られた。これはアミノ酸配列から予想される4042 Da と約 89 Da 異なっていたが、この差異は2個のメチオニンの酸化 (16 Da × 2) とアミノ酸シーケンサーで判読できなかったC末端のグリシン (57 Da) の存在によるものではないかと予想された。最終的には次の実施例3よりこれらの予想通りに、

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-

Arg-Ser-Gly-Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-Lys-Met-Gly-Phe-

Lys-Val-Phe-Gly-NH₂

(2番目のCysと7番目のCysの間でジスルフィド結合を形成する。)

であることが明らかになった。

得られたCRSPのアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示し、CRSP-G

1 y のアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。

【0045】

実施例 3 (相補的 DNA 塩基配列及び前駆体アミノ酸配列)。

プローブは実施例 2 のアミノ酸配列を基に N 末端側

(TG(C/T)AA(C/T)AC(A/C/G/T)GC(A/C/G/T)AC(A/C/G/T)TG(C/T)ATGAC)

及び C 末端側

(CC(A/G)AA(A/C/G/T)AC(C/T)TT(A/G)AA(A/C/G/T)CCCATA)

で合成プライマーを作成し、ブタ遺伝子を鋳型に PCR 法で増幅することにより作成した。

相補的 DNA λ ファージライブラリーはブタ視床下部 mRNA (3 μ g) よりファルマシア社 Time saver cDNA 作成キット及び Stratagene 社の λ ZAP II を用いて作成した。スクリーニングの方法は大腸菌を λ ファージ (約 10 万個の独立したクローンを持つ) に感染させて LB 培地を含む 0.7% アガロースと混合し、LB 培地を含む 1.5% 寒天培地を敷いた培養皿に播き、37℃で 8 時間ほど培養した。冷蔵庫で 2 時間ほど冷却した後、形成したプラークをナイロンフィルターに転写し、アルカリ変性 (0.5M 水酸化ナトリウム + 1.5M 塩化ナトリウム溶液で 2 分間、0.5M トリス塩酸塩 (pH 7.5) + 1.5M 塩化ナトリウム溶液で 2 分間、45 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0) + 450 mM 塩化ナトリウムで 5 分間処理を行う) 後、フィルターを 80℃で 2 時間乾燥させた。次に乾燥したフィルターをプレハイブリダイゼーション液 (50% ホルムアミド、0.09M クエン酸ナトリウム (pH 7.0)、0.9M 塩化ナトリウム、0.5% 牛血清アルブミン、0.5% フィコール、0.5% ポリビニルピロリドン、0.5% ラウリル硫酸ナトリウム) に 37℃で 2 時間浸し、そこに ³²P で標識したプローブを加え、42℃で 16 時間ハイブリダイゼーションを行う。フィルターは洗浄液で洗浄 (30 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0)、300 mM 塩化ナトリウム、0.1% ラウリル硫酸ナトリウム溶液、室温 5 分間を 2 回、3 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0)、30 mM 塩化ナトリウム、0.1% ラウリル硫酸ナトリウム溶液、65℃1 時間を 2 回行う) 後、X 線フィルムに感光させ、放射線により感光する部分を培養皿上のプラークと照合し、プ

ラークから陽性クローンを単離した。

単離された陽性 λ ファージクローンはStratagene社ヘルパーファージR408を用いてDNAシーケンスに適したベクターであるプラスミドpBluescriptに変換し、塩基配列はサンガー法により決定した。

決定された塩基配列を配列表の配列番号3に示し、そのアミノ酸配列を配列番号4に示す。

得られたCRSPは、ブタカルシトニン (CT) 遺伝子関連ペプチド (CGRP) と71.1%、ヒトCGRP-Iと63.2%、ヒトCGRP-IIと71.1% のアミノ酸配列上の相同性を有していた (図2参照)。

【0046】

実施例4 (発現部位)

遺伝子の発現量のためのRNAの調製は酸性グアニジンフェノールクロロホルム抽出法により行った。約1gのブタ組織を5mlの変性液 (4Mグアニジンチオシアン塩、25mMクエン酸ナトリウム (pH7.0)、0.1M 2-メルカプトエタノール、0.5%サルコシン酸ナトリウム) でホモジェナイズし、1/10量の2M酢酸ナトリウム、等量の水飽和フェノール、1/5量のクロロホルムを加えよく攪拌した後、遠心分離を行った。次に水層を分離してそこに等量の2-プロパノールを加えよく攪拌し-20℃で1時間静置し、再び遠心分離し、沈殿 (RNA) を回収した。このRNAのうち30 μ gをホルムアルデヒド-アガロース変性ゲル (1%アガロース、2.2Mホルムアルデヒド、20mM Mops (pH7)、8mM酢酸ナトリウム、1mM EDTA) を用いて電気泳動を行い、泳動後のゲルを十分水洗してホルムアルデヒドを除去した後、0.05M水酸化ナトリウムに15分間、0.3Mクエン酸ナトリウム (pH7) + 3M塩化ナトリウム溶液で45分間処理した。次にゲルに含まれるRNAをキャピラリープロット法でナイロンフィルターに転写し、RNAを転写したフィルターを80℃で乾燥させた。次にフィルターをAmbion社のULTRAhybハイブリダイゼーション液に37℃2時間浸した後、CRSPを暗号化している部分 (cDNA上の346番目-488番目の間の塩基対) を³²Pで標識したプローブを加え、42℃で16時間ハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーション後、

フィルターを洗浄液で洗浄（30 mM クエン酸ナトリウム（pH 7.0）、300 mM 塩化ナトリウム、0.1% ラウリル硫酸ナトリウム溶液、室温5分間を2回、1.5 mM クエン酸ナトリウム（pH 7.0）、15 mM 塩化ナトリウム、0.1% ラウリル硫酸ナトリウム溶液、65℃1時間を2回行う）後、X線フィルムに感光させ、RNAの定量を行った。

結果を図3に示す。

【0047】

実施例5 （発現量の測定）

各組織のペプチド含量は合成ペプチドに対して作成した抗体を利用してラジオイムノアッセイにより測定した。組織約1gを10倍量の水で煮沸し、氷冷後酢酸を1Mになるよう加え、ホモジェナイズ後、遠心分離により不溶物を除去して抽出液を作成した。この抽出液を凍結乾燥後、緩衝液（50 mM リン酸ナトリウム（pH 7.4）80 mM 塩化ナトリウム、25 mM EDTA、0.5% Triton X-100、0.5% 牛血清アルブミン0.05% アジ化ナトリウム）に溶解し、100 μ l ずつ試験管に取り分けた。これらのCRSPを含む緩衝液及び既知濃度のCRSPを溶解した緩衝液に等量の放射性標識したCRSP及び抗体を加えて攪拌し、48時間4℃で静置した後、100 μ l の γ -globulin 及び500 μ l の23% ポリエチレングリコールを添加してよく混和し、遠心後、沈殿の放射活性を既知濃度のCRSPにより作成した標準曲線の放射活性と比較することでCRSP量を定量した。

結果を表1に示す。表1は段落番号24に記載したものである。

【0048】

実施例6 （LLC-PK₁細胞におけるCRSPのcAMP産生促進作用）

LLC-PK₁細胞を栄養培地（10%牛胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地（DMEM））中で培養し、2日後、0.05%牛血清アルブミンを含むDMEMに溶解したCRSPを細胞の栄養培地と置き換えて30分間インキュベーション後、培地を回収して、分泌されてきたcAMPの量をcAMP特異的な抗体を用いたラジオイムノアッセイにより定量した。

結果を図4に示す。

【0049】

実施例7 (LLC-PK₁細胞におけるCRSP存在下でのナトリウムイオン、カルシウムイオンの取り込みの作用)

LLC-PK₁細胞を6ウェル培養皿上、DMEM(10%FCSを含む)中で2日間培養した。ナトリウムイオンの取り込みの測定は以下のように行った。

LLC-PK₁細胞の培養液をハंकスー塩化コリン液に置換し、一定量の放射活性をもつ塩化ナトリウム(^{22}Na)及びCRSPをそれぞれ終濃度0M、 10^{-8}M 、 10^{-7}M 、 10^{-6}M になるように添加し、10分後、細胞を洗浄して細胞外液に含まれる ^{22}Na を完全に除去し、細胞内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定した。また同様にLLC-PK₁細胞の培養液をハंकスー塩化コリン液に置換し、一定量の放射活性を持つ塩化ナトリウム(^{22}Na)及びそれぞれCRSPとNa/H共輸送体阻害剤であるアミロライド誘導体5-(N-エチル-N-イソプロピル)-アミロライド(5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride(EIPA))を終濃度CRSP 0M+EIPA 0M、CRSP 10^{-6}M +EIPA 0M、CRSP 10^{-6}M +EIPA 10^{-8}M 、CRSP 10^{-6}M +EIPA 10^{-7}M 、CRSP 10^{-6}M +EIPA 10^{-6}M 、CRSP 0M+EIPA 10^{-6}M となるよう添加し、10分後、細胞を洗浄して細胞外液に含まれる ^{22}Na を完全に除去し、細胞内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定した。

EIPAの非存在下における結果を図5に、またEIPA存在下における結果を図6にそれぞれ示す。

【0050】

カルシウムイオンの取り込みは以下のように行った。LLC-PK₁細胞は塩化カルシウム濃度を0mMに下げたハंकス液(カルシウムフリーハंकス液)で洗浄した。CRSPと共に塩化カルシウム(^{45}Ca)を細胞上のカルシウムフリーハंकス液に添加し、10分後、細胞を洗浄して細胞外液に含まれる ^{45}Ca を完全に洗浄し、細胞内に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターにより測定した。

結果を図7に示す。

【0051】

実施例8 (CRSPによる細胞増殖の抑制)

LLC-PK₁細胞を24ウェルコラーゲンプレート上、DMEM(10% FCSを含む)中で2日間培養し、細胞をDMEMで一度洗った後、 $0, 10^{-12} \sim 10^{-6}$ MのCRSPを含むDMEM(10% FCSを含む)に置換し培養した。2時間後、 125 Iで標識したプロモデオキシウリジンを含むDMEM(0.1% BSAを含む)を各ウェルに添加して、5時間後核内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定し、細胞増殖に伴って合成されたDNA量を測定した。

結果を図8に示す。

同様に10,000細胞/ウェルのLLC-PK₁細胞を24ウェルコラーゲンプレートに播き、DMEM(10% FCSを含む)で24時間培養した。各ウェルをDMEMで一度洗った後、0 M、 10^{-8} M、 10^{-6} Mの濃度のCRSPを含むDMEM(10% FCSを含む)に培地を置換し培養した。24時間後、培養皿上の細胞をトリプシン-EDTA溶液で剥がし、細胞数を計数板にて計測した。

結果を図9に示す。

【0052】

実施例9 (カルシトニン受容体へのCRSPの作用)

ブタカルシトニン受容体(CTR)を哺乳類発現ベクターp cDNA3.1に導入し、アカゲザル腎細胞(COS-7)に発現させてCRSP刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイにより測定した。

結果を図10に示す。

同様にオポッサム腎細胞(OK細胞)にCTRを発現させてCRSP刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイ法により、ナトリウムイオンの取り込みを放射活性を持つ塩化ナトリウム(22 Na)の取り込みをガンマカウンターで計測することにより測定した。

結果を図11及び図12にそれぞれ示す。

【0053】

実施例10 (CRSPのラットの血圧及び血漿中イオン濃度の変化)

生理食塩水に溶解した 16 nmol/kg に相当する量のCRSPを麻酔条件下でラット頸静脈より短期間に一度に投与した。

結果を図13及び図14に示す。

【0054】

実施例11 (CRSP-Glyペプチドの抽出、単離)

ブタ脳 20 kg を4倍量の水中で10分間煮沸し、冷却後、最終的に 1 M になるよう酢酸を添加してホモジェナイズし、遠心分離で不溶物を除去してブタ脳抽出液を作成した。これを限外濾過(ペリコンカセットPLAC#000-05, ミリポア社)で脱塩し、脱塩後の抽出液に冰冷下、終濃度 66% になるようにアセトンをゆっくり加えた。沈殿を遠心分離により除去し、上清をエバポレーターによりアセトン除去した後、逆相のカラム(LC-SORB SPW-C-ODS、ケムコ、 $1.5\text{ }\mu\text{m}$)に吸着させた。カラムを3倍量の 0.5 M 酢酸で洗浄した後、3倍量の溶出バッファー(水:アセトニトリル: 10% トリフルオロ酢酸= $40:60:1$)でペプチド画分を溶出した。溶出液はエバポレーターによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥した。凍結乾燥標品は秤量後 1 M 酢酸に溶解し、陽イオン交換樹脂(SP-Sephadex、ファルマシア社、 $3\times 28\text{ cm}$)の充填されたオープンカラムに吸着させ、素通り画分(SP-I)、 2 M ピリジン($\text{pH } 8.0$)で溶出される溶出画分(SP-II)、 2 M ピリジン-酢酸($\text{pH } 5.0$)で溶出される画分(SP-III)に分画し、SP-III強イオン性画分を得た。この画分を凍結乾燥した後 1 M 酢酸に溶解し、ゲル濾過(SephadexG-50、ファルマシア社、 $7.5\times 145\text{ cm}$ 、 1 M 酢酸、流速 100 ml/h)で分子量に応じてフラクションに分画し、分子量 1 kDa から 5 kDa に相当する部分を集めた。これを再びゲル濾過(SephadexG-25、ファルマシア社、 $7.5\times 145\text{ cm}$ 、 1 M 酢酸、流速 100 ml/h)で、分子量に応じた画分に分画し、分子量 2 kDa から 4 kDa に相当する部分を集め、凍結乾燥した。

【0055】

凍結乾燥標品をイオン交換クロマトグラフィー(CM52、Whatman社、 $2.4\times 45\text{ cm}$ 、A液: 10 mM ギ酸アンモニウム($\text{pH } 6.5$):アセトニトリル= $9:1$ 、

B液：1Mギ酸アンモニウム（pH 6.5）：アセトニトリル＝9：1、流速35 ml/h）を用いて、10 mMから0.5 Mまでギ酸アンモニウムによる濃度勾配溶出を行った。

ここで各画分の1/1000量を凍結乾燥し、凍結乾燥標品をダルベッコ改変イーグル培地（DMEM、0.05% 牛血清アルブミンを含む）に溶解した培地でブタ腎臓由来の上皮細胞LLC-PK₁を刺激して37℃1時間インキュベーションし、培地に分泌されるcAMP量をラジオイムノアッセイにより定量した。

方法は未知量のcAMPを含む培地及び既知濃度のcAMPを含む培地100 μ lに、4%になるように無水コハク酸を溶解したジオキサントリエチルアミン混合液（ジオキサン：トリエチルアミン＝4：1）を等量加え、30分間室温で放置してcAMPをサクシニル化し、遠心エバポレーターで乾固した後、1 mlの緩衝液（50 mM酢酸ナトリウム（pH 6.2）、1 mM EDTA、0.025% アジ化ナトリウム、0.5% 血清アルブミン、0.01% Triton X-100）に溶解し、その内100 μ lずつを試験管に取り分け、50 μ lずつ放射性標識したサクシニル化cAMP及び抗体を加え、4℃で48時間放置した。次に100 μ lの1% γ -グロブリン及び500 μ lの25%ポリエチレングリコールを添加してよく混和し、遠心分離を行って沈殿の放射活性をガンマカウンターを用いて測定し、既知濃度のcAMPにより作成した標準曲線の放射活性と比較することでcAMP量を定量した。

CRSP-GlyによるcAMP産生の上昇はギ酸アンモニウム（pH 6.5）約0.27 Mで溶出される画分に観察された。さらに陽イオン交換HPLC（TSK-gel CM-2SW、東ソー、7.8×300mm、A液：10 mMギ酸アンモニウム（pH 3.8）：アセトニトリル＝9：1、B液：1 Mギ酸アンモニウム（pH 3.8）：アセトニトリル＝9：1、流速2 ml/min）でギ酸アンモニウムの濃度勾配溶出を行った。再びそれぞれの画分の1/1000量を取り、活性を測定し、活性の観察された画分（ギ酸アンモニウム（pH 3.8）約0.36 Mで溶出）を、さらに逆相HPLC（C₁₈ 218TP54、Vydac社、4.6×250mm、A液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸＝90：10：1、B液：水：アセト

ニトリル：10%トリフルオロ酢酸＝40：60：1、流速1ml/min）でアセトニトリルによる濃度勾配溶出を行い、活性を持つ画分（アセトニトリル約32%で溶出）を得た。これを再び逆相HPLC（diphenyl 219TP5215、Vydac社、2.1×150mm、A液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸＝90：10：1、B液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸＝40：60：1、流速0.2ml/min）にて分離し、（アセトニトリル約29%で溶出）最終的な精製標品を得た。

実際の精製行程において約50 pmolのペプチドが得られた。このペプチドの分子量は4157 Daで理論上の等電点は11.41と算出された。また上述の通りVydac社のC18カラム（4.6×250mm、218TP54）で0.1% TFA存在下、アセトニトリル濃度約32%で溶出される程度の疎水性を持っていた。

【0056】

実施例12 （CRSP-GlyのcAMP産生促進作用）

ブタカルシトニン受容体（CTR）を哺乳類発現ベクターp cDNA3.1に導入し、アカゲザル腎細胞（COS-7）に発現させてCRSP又は、CRSP-Gly刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイにより測定した。

結果を図15に示す。

【0057】

実施例13 （イヌ・ウシCRSPの遺伝子クローニング）

RNAはイヌ及びウシの甲状腺より、酸性グアニジンフェノールクロロホルム抽出法により抽出した。mRNAの精製は宝酒造Oligotex-dT30 mRNA精製キットを用いて行った。相補的DNA λファージライブラリーはイヌ及びウシの甲状腺mRNA（3 μg）よりファルマシア社Time saver cDNA作成キット及びStratagene社 λZAPIIを用いて作成した。プローブはブタカルシトニン受容体刺激ペプチドの全長約700 bpを用いた。スクリーニングの方法は大腸菌をλファージ（約30万個の独立したクローンを持つ）に感染させてLB培地を含む0.7%アガロースと混合し、LB培地を含む1.5%寒天培地を敷いた培養皿に播き、37℃で8時間ほど培養した。冷蔵庫で2時間ほど冷却した後、形成したプラークをナイロンフィルターに転写し、アルカリ変性（0.5M水酸化

ナトリウム+1.5M塩化ナトリウム溶液で2分間、0.5Mトリス-塩酸塩 (pH 7.5) + 1.5M塩化ナトリウム溶液で2分間、45mMクエン酸ナトリウム (pH 7.0) + 450mM塩化ナトリウムで5分間処理を行う) 後、フィルターを80℃で2時間処理した。次にフィルターをプレハイブリダイゼーション液 (20%ホルムアミド、0.09Mクエン酸ナトリウム (pH 7.0)、0.9M塩化ナトリウム、0.5%牛血清アルブミン、0.5%フィコール、0.5%ポリビニルピロリドン、0.5%ラウリル硫酸ナトリウム) に37℃で2時間浸し、そこに 32 Pで標識したプローブを加え、42℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。フィルターは洗浄液で洗浄 (30mMクエン酸ナトリウム (pH 7.0)、300mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、室温5分間を2回、15mMクエン酸ナトリウム (pH 7.0)、150mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、60℃1時間を2回行う) 後、X線フィルムに感光させ、放射線により感光する部分を培養皿上のブラックと照合し、ブラックから陽性クローンを単離した。単離された陽性ファージクローンはStratagene社ヘルパーファージR408を用いてDNAシーケンスに適したベクターであるプラスミドpBluescriptに変換し、塩基配列はサンガー法により決定した。

決定されたウシCRSPをコードするcDNAの塩基配列を後記配列表の配列番号7に示し、そのコードするウシCRSPの前駆体ペプチドのアミノ酸配列を配列番号8に示す。また、ウシCRSPのアミノ酸配列を配列番号6に示す。

決定されたイヌCRSPをコードするcDNAの塩基配列を後記配列表の配列番号10に示し、そのコードするイヌCRSPの前駆体ペプチドのアミノ酸配列を配列番号11に示す。また、イヌCRSPのアミノ酸配列を配列番号9に示す。

【0058】

実施例14 (ウシCRSP又はイヌCRSP刺激によるcAMP産生量の定量)

LLC-PK₁細胞を栄養培地 (10%牛胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)) 中で培養した。2日後、細胞を0.05%牛血清アルブミンを含むDMEMで2回洗浄し、培養皿中の培地を0.5mMの3-イソブチ

ルー 1 - メチルキサンチン (3-isobutyl-1-methylxanthine) 及び 0.05% 牛血清アルブミンを含む DMEM (DMEM/BSA/IBMX) に置き換えて 37℃ で 30 分間インキュベーションした。インキュベーション後、培地を 0M 及び $10^{-12} \sim 10^{-6}$ M になるよう CRSP を溶解した DMEM/BSA/IBMX に置換し、37℃ で 10 分間インキュベーションした。インキュベーション後、培養皿中の培地を除き、そこにエタノールを加え、細胞を破碎するために培養皿を冷凍庫で一回凍結させた。次にエタノールを試験管に移し、遠心エバポレーターを用いて標品を乾固させた。乾固した標品は DMEM に溶解し、100 μ l ずつ取り分け、4% になるように無水コハク酸を溶解したジオキサントリエチルアミン混合液 (ジオキサン: トリエチルアミン = 4 : 1) を等量加え、30 分間室温で放置して cAMP をサクシニル化させた。再び遠心エバポレーターで乾固した後、1 ml の緩衝液 (50 mM 酢酸ナトリウム (pH 6.2)、1 mM EDTA、0.025% アジ化ナトリウム、0.5% 血清アルブミン、0.01% Triton X-100) に溶解し、その内 100 μ l ずつを試験管に取り分け、50 μ l の放射性標識したサクシニル化 cAMP 及び 50 μ l の抗体を加え、4℃ で 48 時間放置した。次に 100 μ l の 1% γ -グロブリン及び 500 μ l の 25% ポリエチレングリコールを添加してよく混和し、遠心分離を行って沈殿の放射活性をガンマカウンターを用いて測定し、既知濃度の cAMP により作成した標準曲線の放射活性と比較することで cAMP 量を定量した。

結果を図 16 に示す。

【0059】

実施例 15 (CRSP-2 及び CRSP-3/CT-2 前駆体遺伝子のクローニング)

ブタ遺伝子ライブラリーはクローンテック社から購入した。プローブはブタカルシトニン受容体刺激ペプチドの前駆体 cDNA 全長約 700 bp を用いた。スクリーニングの方法は大腸菌をブタ遺伝子が挿入された λ ファージ (約 100 万個の独立したクローンを持ち、その内約 30 万個について行った) に感染させて LB 培地を含む 0.7% アガロースと混合し、LB 培地を含む 1.5% 寒天培地を敷いた培養皿に播き、37℃ で 8 時間ほど培養した。冷蔵庫で 2 時間ほど冷却

した後、形成したブランクをナイロンフィルターに転写し、アルカリ変性（0.5 M水酸化ナトリウム + 1.5 M塩化ナトリウム溶液で2分間、0.5 Mトリス-塩酸塩（pH 7.5） + 1.5 M塩化ナトリウム溶液で2分間、45 mMクエン酸ナトリウム（pH 7.0） + 450 mM塩化ナトリウムで5分間処理を行う）後、フィルターを80℃で2時間処理した。次にフィルターをプレハイブリダイゼーション液（20%ホルムアミド、0.09 Mクエン酸ナトリウム（pH 7.0）、0.9 M塩化ナトリウム、0.5%牛血清アルブミン、0.5%フィコール、0.5%ポリビニルピロリドン、0.5%ラウリル硫酸ナトリウム）に37℃で2時間浸し、そこに ^{32}P で標識したプローブを加え、42℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。フィルターは洗浄液で洗浄（30 mMクエン酸ナトリウム（pH 7.0）、300 mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、室温5分間を2回、7.5 mMクエン酸ナトリウム（pH 7.0）、75 mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、55℃、1時間を2回行った）後、X線フィルムに感光させ、放射線により感光する部分を培養皿上のブランクと照合し、ブランクから陽性クローンを単離した。単離された陽性 λ ファージクローンは種々の制限酵素を用いて切断し、サザンブロットティング法により解析を行って制限酵素地図を作製した後、適当な制限酵素を用いて陽性クローンを含むDNAをpBlue scriptにサブクローニングした。塩基配列はサンガー法により決定した。スクリーニングの結果、25個の陽性クローンを得ることができた。制限酵素による解析及び塩基配列決定の結果、10個のクローンはCRSPの遺伝子をコードしていることが判明した（図17）。残りの15個のクローンの内、9個は別の遺伝子を（図18及び図19）、6個はさらに別の遺伝子をコードしていることが判った。9個の遺伝子はCRSPと相同性を持つ配列を有していた。この遺伝子をCRSP-2と名付けた。また別の6個の遺伝子はCRSPとCTに相同性を有する配列を持っていた。これら遺伝子をCRSP-3及びCT-2と名付けた。図17～19において下線部がエクソンを示す。

CRSP遺伝子の塩基配列を後記配列表の配列番号5に記載する。また、CRSP-2遺伝子を配列表の配列番号15に記載する。CRSP-3遺伝子とCT

- 2 遺伝子を含む DNA 断片の塩基配列を配列表の配列番号 23 に記載する。

【0060】

CRSP や CT/CGRP の遺伝子配列を参考に推定した cDNA 配列は図 20~22 に示す (図 20: CRSP-2、図 21: CRSP-3、図 22: CT-2)。図 20~22 において、実線で囲まれた部分が成熟ペプチドで、灰色がアミドに変換されると推定されるグリシン、斜体部がシグナルペプチド、図 22 における成熟体の N 末端側にあるグルタミンはピログルタミン酸に変換されると推定される。また各 CRSP と CGRP や AM、CT-2 と CT のアミノ酸の比較を行ったものが図 23 である。

CRSP-2 の cDNA の塩基配列を後記配列表の配列番号 13 に、CRSP-3 の cDNA を配列番号 17 に、CT-2 の cDNA を配列番号 21 に記載する。

CRSP-2、CRSP-3 と CT-2 の成熟体アミノ酸配列は以下であると予想される。

CRSP-2 :	Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Ser-Cys-Val-Thr-His	10
	Lys-Met-Thr-Gly-Trp-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly	20
	Ser-Val-Ala-Lys-Asn-Asn-Phe-Met-Pro-Thr	30
	Asn-Val-Asp-Ser-Lys-Ile-Leu-NH ₂	37
CRSP-3 :	Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Ile-Cys-Val-Thr-His	10
	Lys-Met-Ala-Gly-Trp-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly	20
	Ser-Val-Val-Lys-Asn-Asn-Phe-Met-Pro-Ile	30
	Asn-Met-Gly-Ser-Lys-Val-Leu-NH ₂	37
CT-2 :	pGlu-Cys-Asn-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu	10
	Gly-Thr-Tyr-Thr-Trp-Asp-Val-Asn-Lys-Phe	20
	Tyr-Ala-Phe-Pro-Leu-Thr-Thr-Thr-Gly-Ile	30
	Arg-Val-Ser-NH ₂	33

CRSP-2 のアミノ酸配列を後記配列表の配列番号 12 に、CRSP-3 を配列番号 16 に、CT-2 を配列番号 19 に記載する。

【0061】

実施例 16 (CRSP-2 の前駆体 cDNA クローニング)

cDNA ライブラリーは CRSP の cDNA クローニングを行った時に作成したブタ視床下部 cDNA が挿入された λ ファージライブラリーを用いた。プローブはブタカルシトニン受容体刺激ペプチドの全長約 700 bp を用いた。スクリーニングの方法は大腸菌をブタ視床下部 cDNA が挿入された λ ファージに感染させて LB 培地を含む 0.7% アガロースと混合し、LB 培地を含む 1.5% 寒天培地を敷いた培養皿に播き、37℃ で 8 時間ほど培養した。冷蔵庫で 2 時間ほど冷却した後、形成したプラークをナイロンフィルターに転写し、アルカリ変性 (0.5 M 水酸化ナトリウム + 1.5 M 塩化ナトリウム溶液で 2 分間、0.5 M トリス-塩酸塩 (pH 7.5) + 1.5 M 塩化ナトリウム溶液で 2 分間、45 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0) + 450 mM 塩化ナトリウムで 5 分間処理を行う) 後、フィルターを 80℃ で 2 時間処理した。次にフィルターをプレハイブリダイゼーション液 (20% ホルムアミド、0.09 M クエン酸ナトリウム (pH 7.0)、0.9 M 塩化ナトリウム、0.5% 牛血清アルブミン、0.5% フィコール、0.5% ポリビニルピロリドン、0.5% ラウリル硫酸ナトリウム) に 37℃ で 2 時間浸し、そこに ^{32}P で標識したプローブを加え、42℃ で 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。フィルターは洗浄液で洗浄 (30 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0)、300 mM 塩化ナトリウム、0.1% ラウリル硫酸ナトリウム溶液、室温 5 分間を 2 回、15 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0)、150 mM 塩化ナトリウム、0.1% ラウリル硫酸ナトリウム溶液、60℃ 1 時間を 2 回行う) 後、X 線フィルムに感光させ、放射線により感光する部分を培養皿上のプラークと照合し、プラークから陽性クローンを単離した。単離された陽性 λ ファージクローンは Stratagene 社ヘルパーファージ R408 を用いて DNA シーケンスに適したベクターであるプラスミド pBlue script に変換し、塩基配列はサンガー法により決定した。以上の結果、13 個の陽性クローンを得ることができた。その内 6 個は全て CRSP 前駆体 cDNA のほぼ全長を含むクローンであり、また別の 6 個は全て CRSP-2 前駆体 cDNA のほぼ全長を含むクローンであった (図 20)。残りの 1 個は CRSP-3 の 3' 非翻訳領域をコードする短いクローンであった。

【0062】

実施例17 (CRSP-3及びCT-2 cDNAのクローニング)

ブタ視床下部cDNA (mRNAで20ng分) を鋳型にし、プライマー (CRSP-3 : GCCAGCTTACGTCTCCTTT及びTCAGGTAAGTCAATGATTT、CT-2 : AGCAGCTTTGATTCTGCCAC及びACCTCCTCTCTGATATTCCA) 及び宝酒造PyrobestDNAポリメラーゼを用いて、94℃15秒-55℃15秒-72℃1分-30サイクルのPCR法を行った。増幅されたDNAはアガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色されたバンドをアガロースゲルから回収した後、Stratagene社pBluescriptIIにサブクローニングし、サンガー法により塩基配列を決定した。

CRSP-3のプライマーを用いて増幅されたDNAの塩基配列の解析を行った結果、CRSP-3をコードしている事が判明した (図5)。一方CT-2のプライマーを用いたPCRではDNAの増幅が観察されなかった。

【0063】

実施例18 (RT-PCRによるCRSP、CRSP-2、CRSP-3、CT-2、CT、CGRP、GAPDHの遺伝子発現量の高感度定量)

ブタの各組織のtotal RNA (4µg) 及びoligo dTプライマー及び東洋紡Revertra Ace逆転写酵素キットを用いて鋳型cDNAを作成し、そのうち1/40をRT-PCRに用いた。各遺伝子cDNAを増幅するためのPCRは東洋紡rTaqポリメラーゼを用いて94℃15秒-60℃15秒-72℃1分-30サイクルで行い、プライマーは以下の配列を用いた。

CRSP : CTCTCTGAGGAGGAATCACG 及び GAGTTCAGAGTCATAGTAACC

CRSP-2 : CTCACAGAGGAGGAAGTGTC及びTAGAGTTCAGTTCCTTGGTG

CRSP-3 : AGCAGCTTTGATTCTGCCAC及びTGCAGTGAAAGCAACTTGAG

CT-2 : AGCAGCTTTGATTCTGCCAC及びACCTCCTCTCTGATATTCCA

CT : GCCACTCAGTGAGAAGGAAG及びTGAGGCATGAGGGATGAAGC

CGRP : GCCACTCAGTGAGAAGGAAG及びTCACCTTACATGTGTCCCA

GAPDH : TCACTGCCACCCAGAAGACT及びAGTGGTCGTTGAGGGCAATG

増幅されたDNAは3%アガロースゲルで電気泳動を行い、フジフィルムFL

A2000を用いて解析した。結果としてCRSP-2及びCRSP-3は中枢及び甲状腺、卵巣に発現が観察された。一方CT-2は何れの組織でもバンドが増幅されず、発現が観察されなかった(図24)。CT-2は図24に示された組織以外に局限して発現しているものと考えられる。

【0064】

【発明の効果】

本発明は、中枢神経に発現し、カルシトニン受容体に強く作用する新規かつ有用なペプチドを提供するものである。本発明のペプチドは、カルシトニン遺伝子関連ペプチドと高い相同性を有し、カルシトニンよりも強い作用を有する。また中枢神経系に多量に発現しており、新規なカルシトニン様ペプチドとして骨粗鬆症や鎮痛剤などとして極めて有用なペプチドである。

【0065】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science And Technology Corporation
National Cardiovascular Center

<120> A New Peptide Having Production Activity of cAMP

<130> PA909444

<140>

<141>

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 38

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<221> modified amino acid

<222> (38)

<223> glycine amide

<220>

<223> CRSP

<400> 1

Ser Cys Asn Thr Ala Thr Cys Met Thr His Arg Leu Val Gly Leu Leu

1

5

10

15

Ser Arg Ser Gly Ser Met Val Arg Ser Asn Leu Leu Pro Thr Lys Met

20

25

30

Gly Phe Lys Val Phe Gly

35

<210> 2

<211> 39

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<223> CRSP-Gly

<400> 2

Ser Cys Asn Thr Ala Thr Cys Met Thr His Arg Leu Val Gly Leu Leu

1 5 10 15

Ser Arg Ser Gly Ser Met Val Arg Ser Asn Leu Leu Pro Thr Lys Met

20 25 30

Gly Phe Lys Val Phe Gly Gly

35

<210> 3

<211> 679

<212> DNA

<213> Swine

<220>

<223> CRSP cDNA

<400> 3

tcaagtgtct ctgccgcttc ttccacagtg ccatcgccctg acgccaacgc tgctgcctct 60
gctccctcct ctgctccagt ccacctggtt cctgctgccc gaggggcacc atgggcttct 120
ggaaatttcc gcccttcctg gttctcagca tcctggctcct gtaccaggca ggcatgttcc 180
acacagcacc aatgagggtct gcctttggga gcccttttga tcctgctacc ctctctgagg 240
aggaatcacg cctccttttg gctgcaatgg tgaatgacta tgagcagatg aaggcccgtg 300

agatgcagaa gcagagggca cagggctccg gcatcagtgt ccagaagaga tcctgcaaca 360
 ctgccacctg catgacccat cggctggtgg gcttgctcag cagatctggg agcatggtga 420
 ggagcaacct gttgccacc aagatgggct tcaaagtctt tgggtgggcgc cgcaggaact 480
 tttggatctg agcagtggga tgattccagg aggaaggta ctatgactct gaactctatt 540
 cgtttaattt acaatgaaag caacctacta aaaaatagca tggaagacat ccatgtatgc 600
 atgcttctgg aaactgaaaa cactcttttc cttgaaataa actaaaacta aatgcaaaat 660
 aaaatcaatg catcaatgc 679

<210> 4

<211> 126

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<223> precursor peptide of CRSP

<400> 4

Met Gly Phe Trp Lys Phe Pro Pro Phe Leu Val Leu Ser Ile Leu Val

1 5 10 15

Leu Tyr Gln Ala Gly Met Phe His Thr Ala Pro Met Arg Ser Ala Phe

20 25 30

Gly Ser Pro Phe Asp Pro Ala Thr Leu Ser Glu Glu Glu Ser Arg Leu

35 40 45

Leu Leu Ala Ala Met Val Asn Asp Tyr Glu Gln Met Lys Ala Arg Glu

50 55 60

Met Gln Lys Gln Arg Ala Gln Gly Ser Gly Ile Ser Val Gln Lys Arg
 65 70 75 80

Ser Cys Asn Thr Ala Thr Cys Met Thr His Arg Leu Val Gly Leu Leu
 85 90 95

Ser Arg Ser Gly Ser Met Val Arg Ser Asn Leu Leu Pro Thr Lys Met
 100 105 110

Gly Phe Lys Val Phe Gly Gly Arg Arg Arg Asn Phe Trp Ile
 115 120 125

<210> 5

<211> 3796

<212> DNA

<213> Swine

<220>

<223> gene CRSP

<400> 5

ctcgaggatc ctgcctcttg tttcccacaa atcctgcctt cctgtgcttg attccagctg 60
 cctgaatcag acccctgct tgggcacaga atcatcaacc tgctgcgcat taacctccca 120
 aaccgcactt ggacatggta gtcttagggg accggggatg ccttgtaatg ctggactctg 180
 ctctacaaag atcacatagc tggggatgga gagggatgtg agcctgcgaa accgaacagg 240
 taaagtttac catgacgtca aactgtcctt aaattcctgc tcactttgcg tgtgtttttc 300
 gttggtgccc accaacctcc ccaccccctc ccaccccgc catcaatgac ctcaatgcaa 360

atacaagtgg ggtggtcctg ttggatgctc caggttctgg acgcaagtag tgacacaatc 420
 ctggggctca ggatctttcc tctcattggg tgcctggagc tctgggacca cccagattc 480
 agagcggcgg gaataagagc agctgctggg gcggggaagg gttagaggca ctaccacct 540
 caagtgtctc tgccgcttct tccacagtgc catcgctga cgccaacgct gctgcctctg 600
 ctccctcctc tgctccagtc cacctgggtc ctgctgcccg gtaagcccgg agattcctgc 660
 taagctgtgg ttctgtttct ctctccctct cctcccttcc ctctctctcc attggatttt 720
 cttagctgat ctcttttccc gtctcaaagt tctgtccac ttctctctgg gtctcttcat 780
 cctgtaatat gccttactgc gcaattcatt ctaggctcct ttcacaggta actctggatg 840
 gtctcagttc ggggattccc tgctctactc ttcctgagct gagctgggct ccagtcttgt 900
 ccccgagca gacgtgctta ggtccgtgtt gggattttgg agctctccag gcacttcagg 960
 gagaggagga tgcaggaata gctttgagca gaagaaactt tcatggatcc catctcctct 1020
 tacctacaag gatcgctgga aatggggctc ggacctggga cagtgcaa at ggggtggcaaa 1080
 taggtgcaat gactgagggg aaagtagcta ttaaacgcaa gccccagttg aaggttctgg 1140
 gaactcccc tccgcaccg ccacccatt taatcttggg tccaattta aggctgtacc 1200
 agcttgtttc ttacaggggtg ctctttgcca gagtatggag cagctggaca gtaaaatttg 1260
 gttcttcagt ttctcaggga ttccaactgc agagatatgt cctcccaact ccccttcccc 1320
 ccagccaggt ataagcaaaa atcaggcatc aggagagatg ctgatgggtt gcactatggg 1380
 aaaagctgtg gtgacaggta ctgcgagtct gtctccagg agtcccggcc aacaggttga 1440
 aggtgagagt gtgggtgtgc tgggcagggg gctatggacg gagacctcct caccagttg 1500
 tctgtctagg ctcttttgct aaaccaaaca tgttgaggc tcaactggatc ttccagcagt 1560
 ccacttggct gaggaggaaa tgatggtgaa aggaaaggac acgagcagcc tgaagccagg 1620
 aagccaggga gttggaggca gaggcaggag cagagcccag gtctgtgggc tcaatgaact 1680
 tggaactgct acaggtggtg acattgttct tcccttgag aggggcacca tgggcttctg 1740
 gaaatttccg cccttcttg ttctcagcat cctggtcctg taccaggcag gcatgttcca 1800
 cacagcacca atgaggtaag acagccctgc caacaagcac actcacttga tgagaatgta 1860
 atataaacgt gtatataaat ttattataag gtggctctgt agaacaatgg atagtgcctt 1920
 gcgtcctat aagtttatca taagctttat gtgtacacaa agtttgtaaa tagacataag 1980
 atatacagta ctcatgattg taaattttat ataacttacc aaacctcaca gcatgctttt 2040
 ttgttttcat caaatatttg tacctttagc acacgtatat gctcatatta ccataattta 2100

agaaatggat tgtatccaat ttgccaaata ctttgctagt aaatttgta ttaaacttga 2160
 tatgggatct acacatctca tttttcacct tcattcaaac tgcattaagc taaaattatt 2220
 ttcccattca aactatcaga aaccaggcaa cctggctgtt taccctgggg aggggcaggc 2280
 aggagatcag aacctgtttt taggcttgct tcccctcctt aggtctgcct ttgggagccc 2340
 ttttgatcct gctaccctct ctgaggagga atcacgcctc cttttggctg caatggtgaa 2400
 tgactatgag cagatgaagg cccgtgagat gcagaagcag agggcacagg gctccgggta 2460
 aggttcctg cccaaggaca acagggcac cttttcttcc tctggtcagg cccaggaagg 2520
 catattttta agtcactttt gagttttctg acccccctgg acatgtctgt gggatgatta 2580
 tggcatttcc cctgacggcc taggattttc tgctgtgatg accttttcta gcagaaatac 2640
 tcaaggttca ctggctctct caaggcagta gtcttccatg acgattctgt cgtacagcac 2700
 ctgcactcaa cctctcactg acgggccttt tctttcttta tcccacaaat cagcatcagt 2760
 gtccagaaga gatcctgcaa cactgccacc tgcatgacc atcggctggg gggttgctc 2820
 agcagatctg ggagcatggg gaggagcaac ctgttgcca ccaagatggg cttcaaagtc 2880
 tttgggtgggc gccgcaggaa cttttggatc tgagcagtgg gatgattcca ggaggaaggt 2940
 gactgccctt tttgtacctt cgggtgggag gacagaggac tgggtattgc aggggtgcat 3000
 tccacaccct aaccctctgt gagcgcatgg gggtaaaacc tccacatggc aagggtgcca 3060
 caccagtgtc tggagaaagg actgataatc cctataactg aaacattggg ctctttctct 3120
 ctgtttctcc agtctctccc tgtgacactg acatcatctg ccaggaaata tagaccctgt 3180
 ttacttaaaa cactgttccc tgggtattaa ttgggttcca gctctagcat tagaatttga 3240
 aaggtaatga ccctaccctt ttggagcata ccttacaatg ttatgaactt ggagcataga 3300
 ctcggattca aatactgtgt ctgtcttcca ctaactgtga ccataggcaa gtatgcctct 3360
 gagcctcagc ttctccttgt aacttgaagg caacaatagt atcctcaata taaaattaa 3420
 ttagtataac atatgacaag agcctgttaa ctaagaatta ataacattct gttacttttt 3480
 tccctcctag gttactatga ctctgaactc tacttcgttt aatttacaat gaaagcaacc 3540
 tactaaaaaa tagcatggaa gacatccatg tatgcatgct tctggaaact gaaaacactc 3600
 ttttcttga aataaactaa aactaaatgc aaaataaaat caatgcatca atgcagttac 3660
 cttgtgtgca tcttttgtgt ataigattct ataatatgat gcatgtctca ttaggtttta 3720
 tggtagcaaa tctggcccct gtcagccaac ctgttggtgg gggcagctct gctaaacctc 3780
 agggtcacat gaattc 3796

<210> 6

<211> 40

<212> PRT

<213> Bos sp.

<220>

<223> BosCRSP

<400> 6

Ala Cys Asn Thr Ala Thr Cys Met Thr His Arg Leu Ala Gly Trp Leu

1 5 10 15

Ser Arg Ser Gly Ser Met Val Arg Ser Asn Leu Leu Pro Thr Lys Met

20 25 30

Gly Phe Lys Ile Phe Asn Gly Pro

35 40

<210> 7

<211> 649

<212> DNA

<213> Bos sp.

<220>

<223> BosCRSP cDNA

<400> 7

tgtctctgcc acttctgcc gactgccact gcctgtgcc aaagctactg ctgctgctcc 60
 ttctctgtct ccagccacc tggcgccggc tgcagagag gtgtcatggg cttctggaag 120
 ttcccccat tcttggtcct cagcatcctg gtcttgtacc aggcaggcat gtttcatgca 180
 gcaccattca ggtctgtctt tgatgggcgt tttgatcctg ctaccctgga tgaggaggaa 240
 tcgcgcctcc tactggctgc gatggtgaat gactacgagc agatgagggc ccgggagtcg 300
 gagaaggctc agaagaccga gggctccgc atccagaaga gagcctgcaa cactgccacc 360
 tgcatgaccc atcgctggc aggctggctg agcagatctg ggagtatggt gaggagcaac 420
 ttgctgccga ccaagatggg tttcaagatc ttcaatgggc cccgcaggaa ctcttggttt 480
 taaacagtga aatgacgctg ggaataaggt caccaggaag ctgaactcta cttttagttt 540
 gcatgaaggc accttacaaa aaaagaaaat agcatggaag ataccatgt atgcatgctt 600
 ctcatattg aaaacattct tcttttcct gaaataaact aaatgcaga 649

<210> 8

<211> 125

<212> PRT

<213> Bos sp.

<220>

<223> precursor peptide of BosCRSP

<400> 8

Met Gly Phe Trp Lys Phe Pro Pro Phe Leu Val Leu Ser Ile Leu Val

1

5

10

15

Leu Tyr Gln Ala Gly Met Phe His Ala Ala Pro Phe Arg Ser Val Phe

20

25

30

Asp Gly Arg Phe Asp Pro Ala Thr Leu Asp Glu Glu Glu Ser Arg Leu

35

40

45

Leu Leu Ala Ala Met Val Asn Asp Tyr Glu Gln Met Arg Ala Arg Glu

50

55

60

Ser Glu Lys Ala Gln Lys Thr Glu Gly Ser Arg Ile Gln Lys Arg Ala

65

70

75

80

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Met Thr His Arg Leu Ala Gly Trp Leu Ser

85

90

95

Arg Ser Gly Ser Met Val Arg Ser Asn Leu Leu Pro Thr Lys Met Gly

100

105

110

Phe Lys Ile Phe Asn Gly Pro Arg Arg Asn Ser Trp Phe

115

120

125

<210> 9

<211> 38

<212> PRT

<213> Canis sp.

<220>

<223> CanisCRSP

<400> 9

Ser Cys Asn Ser Ala Thr Cys Val Ala His Trp Leu Gly Gly Leu Leu

1

5

10

15

Ser Arg Ala Gly Ser Val Ala Asn Thr Asn Leu Leu Pro Thr Ser Met

20

25

30

Gly Phe Lys Val Tyr Asn

35

<210> 10

<211> 686

<212> DNA

<213> Canis sp.

<220>

<223> CanisCRSP cDNA

<400> 10

tctgccacat ccacggtgcc atcgccctgac atcggacgcc aacactgcca cagctgccgc 60
cgccctgtgct ccgagccacc ggctgcctgc agacagagaa gcgtcatggg cttctggaag 120
ttctcccctt tcctggttct cggcatcctg gcgctgtacc aggtgggctt cctccaggca 180
gcaccattca ggtctgcttt ggaaaatcct ccagactctg gtgtgcgcaa tgaggaggaa 240
ttgcgcctcc tcctggctgc agtgatgaag gactatatgc agatgaagac tcatgagctg 300
gagcaggagc aggagactga gggctccagg gttgctgtcc agaagagatc ctgcaactct 360
gccacctgtg tggcccattg gctgggaggc ttgctgagca gagccggaag tgtggcaaac 420
accaacttgc tgcccaccag catgggcttc aaggtctaca atcgacgccg cagggaactt 480
aaggcttaag cagtgacatg accccaggaa gaaggctacc atgaagtga ctctacttct 540
cttaacttct aatgaaaaca acttatagaa tgcagagcat ggaagacaca tacatatgca 600
tgcttactat taaaacattg tgtcttgttt gaaataaagt aaaactaat aaagagaata 660

aaatcataaa aaaaaaaaaa aaaaaa

686

<210> 11

<211> 127

<212> PRT

<213> Canis sp.

<220>

<223> precursor peptide of CanisCRSP

<400> 11

Met Gly Phe Trp Lys Phe Ser Pro Phe Leu Val Leu Gly Ile Leu Ala

1

5

10

15

Leu Tyr Gln Val Gly Phe Leu Gln Ala Ala Pro Phe Arg Ser Ala Leu

20

25

30

Glu Asn Pro Pro Asp Ser Gly Val Arg Asn Glu Glu Glu Leu Arg Leu

35

40

45

Leu Leu Ala Ala Val Met Lys Asp Tyr Met Gln Met Lys Thr His Glu

50

55

60

Leu Glu Gln Glu Gln Glu Thr Glu Gly Ser Arg Val Ala Val Gln Lys

65

70

75

80

Arg Ser Cys Asn Ser Ala Thr Cys Val Ala His Trp Leu Gly Gly Leu

85

90

95

Leu Ser Arg Ala Gly Ser Val Ala Asn Thr Asn Leu Leu Pro Thr Ser

100

105

110

Met Gly Phe Lys Val Tyr Asn Arg Arg Arg Arg Glu Leu Lys Ala

115

120

125

<210> 12

<211> 37

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<221> modified amino acid

<222> (37)

<223> Leucine amide

<220>

<223> CRSP-2

<400> 12

Ser Cys Asn Thr Ala Ser Cys Val Thr His Lys Met Thr Gly Trp Leu

1

5

10

15

Ser Arg Ser Gly Ser Val Ala Lys Asn Asn Phe Met Pro Thr Asn Val

20

25

30

Asp Ser Lys Ile Leu

35

<210> 13

<211> 690

<212> DNA

<213> Swine

<220>

<223> CRSP-2 cDNA

<400> 13

ctcaagtgtc tctgccgctt ctccacagt gccatgcct gacgccaacg ctgctgcctc 60
tgctccctcc tctgctccag tccacctggt tcctgctgcc cgagggggcac catgggcttc 120
tggaatttc cgcccttccct ggttctcagc atcctgggcc tgtaccaggc aggcatgttc 180
cacacagcac ccgtgagatt gcctttggag agcagctttg attctgccac tctcacagag 240
gaggaagtgt cccttctact ggttgcaatg gtgaaggatt atgtgcagat gaaggccact 300
gtgctggagc aggagtcaga ggacttcagc atcactgccc aggagaaatc ctgcaacact 360
gctagctgtg tgaccacaa gatgacaggc tggctgagca gatctgggag cgtggctaag 420
aacaacttca tgcccacaa tgtggactcc aaaatcttgg gctgacgccg cagagagcct 480
caggcctgag ctgtgaaatg actccacaaa gaaggtcacc aaggaactga actctatttc 540
ttttaatctg caatgaaagc aatttatttg aaaaatagca tggaaaacac acatatatgc 600
atgcttcttg cttgaaatac agcttttagc ttgaaataaa ctaaaactaa atgcagaata 660
aaatcattgc agctacctga aaaaaaaaaa 690

<210> 14

<211> 117

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<223> precursor peptide of CRSP-2

<400> 14

Met Gly Phe Trp Lys Phe Pro Pro Phe Leu Val Leu Ser Ile Leu Val
1 5 10 15

Leu Tyr Gln Ala Gly Met Phe His Thr Ala Pro Val Arg Leu Pro Leu
20 25 30

Glu Ser Ser Phe Asp Ser Ala Thr Leu Thr Glu Glu Glu Val Ser Leu
35 40 45

Leu Leu Val Ala Met Val Lys Asp Tyr Val Gln Met Lys Ala Thr Val
50 55 60

Leu Glu Gln Glu Ser Glu Asp Phe Ser Ile Thr Ala Gln Glu Lys Ser
65 70 75 80

Cys Asn Thr Ala Ser Cys Val Thr His Lys Met Thr Gly Trp Leu Ser
85 90 95

Arg Ser Gly Ser Val Ala Lys Asn Asn Phe Met Pro Thr Asn Val Asp
100 105 110

Ser Lys Ile Leu Gly
115

<210> 15

<211> 7673

<212> DNA

<213> Swine

<220>

<223> gene CRSP-2

<400> 15

ggatccacta gttctagata aaatggacaa atacctagaa acagaagacc taccaagatg 60
gaaggatgaa gaaatagaaa attcaaatac acctatgact aggaaggaga atgaagcatt 120
aatccaaaat cttccaacaa agaaaagccc tggatacgat ggcctcattg gtgaatagta 180
ccagacattt aaagaaaacg aataccaatc cttgtcaaac ttttccaaaa acctgaagag 240
aaaggacaca ccctaaccta ttctatgagg caggccaaca ttactctgat accaaagatg 300
gagaaagatt ctgcaaggag aaaacccta cagacaaaat cttttatgac atggatgtgg 360
aaaccctcaa cagtatgcta gggaattgaa ttcagaagcg tattaaaagg atcctacaac 420
atgaccaagt gggatgaatt tctggaatgc aaggatgatt caaaatatga aaattgatca 480
aagtgttata tcacaataat ggaatgtagg gaaaaacaca cctgattatt tccactgata 540
cagaaaatta tttagtaaaa ttcaatacct tttcaggatt aaaaacaaaa actaggtata 600
gaaggagact gcctcagcac aatacaacta tatatgaaaa accaacacca acaccataat 660
ccagggtgga aaactgaaag cttttcccct aagatctgga agaaaatgga aaaaaatttt 720
taagaatttt cagacagatt tgggtctctg gtacactctg agaaatcatc ttttagaatt 780
tttttttttt aaaaataagc acaagaattt catttaaaag aagggaata acatagcctt 840
cagagtttat caggagggtg aatttttttt tccacactag attgtggcta cctgatgcta 900
attttgaggt ttaaacataa tgaaataaga ttgtacagcc aagtgccagc tagtcatgga 960
acttttacct cagtactgtt tagtgcttca gtcctaagaa gtttcaggga gggctgcgtg 1020
caatacaagt aatcggtact tgctgaaggc ctaaaatttc gagtgcactt ggtaaatacag 1080

ggatgggCGC agaggagact ggttctgtaa ctcagactag tgaaccctag aatttagaaa 1140
 ggggtactttt gtgctccaag caaatcctgt tctacctaac taggtccaaa tgctctgcag 1200
 gctgtagtta gagccctctc atagcagga gactgccttg gtgaatctgc cagaggaaat 1260
 gaatttccat tcacattcat tcaacaaca ttgggcgagt gccacctcat gtgcaaaaca 1320
 tgggtctaag tgctaaagaa aagatgttgt tttgtaaact taccgcagc tcagagccag 1380
 gacttcttgg aaagtcagag gacttgagga aggagtcat ctcagcccct ccctcactgg 1440
 agagactggc ttttctttcc aagtaaagct taaaactgct ggaggctaag ttagcacct 1500
 ctgggggcag accctgattc ctgcctctca tcccagccc tttgtgtgtg ggcgcaaag 1560
 atttctgagt gaggaatgaa tgttggcttt gaacaggaaa ggcacaagt gcagccaagg 1620
 gtagaatgct gagectacaa attaacatag ttacaaattt gtcttctaaa ggagtcgttt 1680
 cttagccata gtgcagccac ctttgcatg atcaaaactg tggttcttcc aatgaaaaaa 1740
 gacatcccca gacacacata cttacaaatg atttcagaag attgataggt cggaaatctc 1800
 aggttttgga ttttatttgc aaaagcgttt tgcgcctgag ttttaaactt ttttttttt 1860
 ttttttttt tgtatttttt cacttctagg gcggcttcgg cggcatatgg aaattcccag 1920
 gctaggggtc taataggcgc catagccacc ggcctacgcc agagctactg caacgctgga 1980
 tccgagccgc atctgcaacc tacaccacaa ctcacggcaa tgccggatcg ttaaccact 2040
 gagcaaggcc agggatcgaa cccgcaacct catggttctt actcagattc gttaccact 2100
 gcgccacgac ggccactcca acctaccaga ctcttaatta agtagcagag tccaatttac 2160
 atgccgcacc acatctgtta ccccgagtta gcgaacttgg tcttggaact aactcctcac 2220
 ggaaagccaa gccgagtact cataattata gtgctgaacc cccaaacct ggtctggcct 2280
 gtgcacccaa ttttgccttg tagtagaaac caggatttac ggagcccgag cagtccgcca 2340
 tcctgaactc ttctctttct caccttgcct tcactctgga gtgcacctgc cctctatgaa 2400
 ccagttttc cgttcccttg gtctccgat ccgttgtcta tcctgaggag agcgagatgc 2460
 aagcaccga ttccctagcc ccaatatttt attctcttgc gaaggagaaa agttgaataa 2520
 gggatatctg taaatgagat gttccgagtc cagagagcac aaaccggcaa ggggaacaga 2580
 tgtgccgca ggcagggtgt cggaagata tagagaaggc tcaggttcgg acctgtggct 2640
 caggtcacac tcattggcaga gttcggttta atttcggctc tgcctggggg aaccacttaa 2700
 ctggggctct tgctgccctc caccggcccc cgatgctgtt gcagcgttg ccgcgctgga 2760
 gggctctgtac aggctgctgc ggtttatcgc tgtgtgctca gacacggtga tcctgagcag 2820

catccgaact ggattggggt agatgtgggc acagggctgg aatcacaggt cactggaaca 2880
 tcttggcaaa cagcagccgg aagcaagggg cagctgggca aatggttctg ggacattgat 2940
 gggcttagat gatgaatggt ggggctggag gtcggcttgg cggcttggga agcatctatg 3000
 ccgtgcacgt ccctgccccaa gccagtagg gcaccatctt tccccatatg gtggaccgac 3060
 caccagcgc gactccagac atccgcacag aggtggggat tgggcaaatg gatcgcgatc 3120
 gcacagaatc ccctctgcac ttccctggta agctcttctc gatccctccc tgggtggaga 3180
 gcaggtacat ggctactaat gataccactc ctgaagacg ggaatatgat gccccgttcc 3240
 aaaaattaat atattgaggt gctagaagac actagccga tgatcttact acctagaaaa 3300
 ggcacagctg gaacaaagt tccgtgtgac aaagactgtg atcctgcctc ttgtttccca 3360
 caaatcctgc cttcctgtgc ttgattccag ctgcctgaat cagaccccct gcttgggcac 3420
 agaatcatca acctgctgcg cattaacct ccaaaccgca cttggacatg gtagtcttag 3480
 gggaccgggg atgccttgta acgctggact ctgctctaca aagatcacat agctggggat 3540
 ggagagggat gtgagcctgc gaaaccgaac aggtaaagt taccatgacg tcaaactgtc 3600
 cttaaattcc tgctcacttt gcgtgtgttt ttcgttggg cccaccaacc tccccacccc 3660
 ctccccccc cgccatcaat gacctcaatg caaatacaag tggggtggtc ctgttggatg 3720
 ctccaggttc tggacgcaag tagtgacaca atcctggggc tcaggatctt tcctctcatt 3780
 ggttgccctgg agctctggga ccacccaga ttacagagcgg cgggaataag agcagctgct 3840
 ggtgcgggga agggtagag gcactacca cctcaagtgt ctctgccgt tctccacag 3900
 tgccatgcc tgacgccaac gctgctgcct ctgctccctc ctctgctcca gtccacctgg 3960
 ttctgctgc ccgtaagcc cggagattcc tgctaagctg tggttctgtt tctctctccc 4020
 tctctccct tccctctctc tccattggat tttcttagct gatctcttt cccgtctcaa 4080
 agttcctgtc cacttctctc tgggtctctt catcctgtaa tatgccttac tgcgcaattc 4140
 attctaggct cttttcacag gtaactctgg atggtctcag ttcggggatt ccctgctcta 4200
 ctcttcctga gctgagctgg gctccagtct tgtccccgca gcagacgtgc ttaggtccgt 4260
 gttgggattt tggagctctc caggcacttc agggagagga ggatgcagga atagctttga 4320
 gcagaagaaa ctttcatgga tcccatctcc tcttacctac aaggatcgct ggaaatgggg 4380
 tcgggacctg ggacagtgc aatgggtggc aaataggtgc aatgactgag gggaaagtag 4440
 ctattaaacg caagccccag ttgaaggctc tgggaactcc cctccccgca ccgccacccc 4500
 atttaatctt ggggtccaat ttaaggctgt accggcttgt ttcttacagg gtgctctttg 4560

ccagagtatg gagcagctgg acagtaaaat ttggttcttc agtttctcag ggattccaac 4620
tgcagagata tgtcctccca actccccttc cccccagcca ggtataagca aaaatcaggc 4680
atcaggagag atgctgatgg gttgcactat gggaaaagct gtggtgacag gtactgtgag 4740
tctgtcctcc aggagtcccg gccaacaggt tgaaggtgag agtgtgggtg tgctgggcag 4800
ggggctatgg acggagacct tctcaccag ttgtcctgct aggcttcttt gctaaaccaa 4860
gcatgttgca ggctcactgg atcttcacg agtccacttg gctgaggagg aaatgatggt 4920
gaaaggaaag gacacgagca gcctgaagcc aggaagccag ggagtgggag gcagaggcag 4980
gagcagagcc caggtctgtg ggctcaatga acttggaaact gctacaggtg gtgacattgt 5040
tcttccttg cagaggggca ccatgggctt ctggaaattt ccgcccttcc tggttctcag 5100
catcctggtc ctgtaccagg caggcatgtt ccacacagca cccgtgaggt aagacagcac 5160
tggtggcagt gctctcgctt ccacggccc ccggaatcat atagtctgt attgtgagtt 5220
gtgctgtggt gagtctggct cttgggtggc ttctgtgtat agggggtgtg gggtcctaata 5280
gtatgaatat agtcatgtat ataagtttat tataaatatt ttgtgatcca agataatata 5340
acaaagttaa caaataaata gaagatatac agtattcact ataaatttct aaactcactg 5400
aaccttacag catgtttttg ttgcttttta tgaaatgttt ataactttag caaacctata 5460
tagtaattta gccataattt gagcaatgaa ttgcattcta attaagtaat ttgtcaataa 5520
atttgttatt aaatctgaaa ggtaatctat acaatttctc accctctttc aaattatatt 5580
aatatgaaac cattttcata ttcaactat catttaattt ttaataatgg ctgtatttaa 5640
cactaagctc atacaattcc tgaagatcta accatcagct ttcaaaagcc tacatgatgc 5700
actttcagca gaactacttt gtggacaccc cagagcctaa ctcatgggtga agcagcattt 5760
ttggatgaac actagcctta tgtcctgacc gttgagaatt tcatcagcct tattctcaga 5820
ggaagtggca gaaaccagga aatctggctg cttatcctag ggctgtggta ggctcagagc 5880
gcatgttggg cttgctttcc cttcccagat tgcctttgga gagcagcttt gattctgcca 5940
ctctcacaga ggaggaagtg tcccttctac tgggtgcaat ggtgaaggat tatgtgcaga 6000
tgaaggccac tgtgctggag caggagtcag aggacttcag gtcagtcttt gcacccctcc 6060
cagaatatgg cttaccctct ccctagagta ccaggaaggc atatccttaa gaatgagatt 6120
tggtatagtg ccataagcct tgatgtccag tctcataagc cttggtttat ttttagttta 6180
ttacacagga gagattgtct attacagttc tgatttccag gtccagtaat gcagagccac 6240
ctttgggttt tctgacaccc ctgaaaatgt ctatggggag tgatgatgca tttcccaaa 6300

agccctatgg ttttctgttg ggattttgtg tttagcagaa acatttcagg ttcactggtc 6360
cctctcagag ctgtaatttt ccactgatgg tcagtccctgg ggggaatcac ttgccctcaa 6420
gctgtcattg gcaggccttc tctttgtctc catcctgaaa atcagcatca ctgcccagga 6480
gaaatcctgc aacactgcta gctgtgtgac ccacaagatg acaggctggc tgagcagatc 6540
tgggagcgtg gctaagaaca acttcatgcc caccaatgtg gactccaaaa tcttgggctg 6600
acgccgcaga gagcctcagg cctgagctgt gaaatgactc cacaaagaag gtgactgctc 6660
tagaacatgg gatagcaggg caaatggctg ggtatttcag ggggtttggc tacactctaa 6720
ccctccctga gcctgtactg taaaaaaaaa tccataatga agttgctgac ccattatcc 6780
tcagaaagaa aagagaatcc taatagccaa aaccctata acttaggttc atttctattt 6840
ttttccagtg tctcccagtg actctgaggt catctgtcag gaaacataga ttctattctt 6900
ttttcttttc tttttggcta cacccaaggc atgtgaaagt ttttgggcca gggattgaat 6960
ctgaaccata gctgtgacct atgcagtacc tgtggcaaca ctggatcctt aacccaatgt 7020
accacatcag gaactcctag gtcctattat ttaaaacact gttccctgca gttataattg 7080
tgattattct agtttttgag ttgaaagggt aatgatctta tccagtgagt ttgaagtata 7140
actacaatgt cacatatatc tgaattcaga gcattgactt ggtttcaaat gcgatgtctg 7200
tcttccacta actatacaac catgggccag accctctctg aacctcagtt ctacatgaaa 7260
ctttaaggca acaataatat ttacctgtta tcattaatat aaaaagtaac tgagataatt 7320
catggtaaga gcctcactat taataagtaa taatattcta gctcttattt tttttctcc 7380
taggtcacca aggaactgaa ctctatttct tttaatctgc aatgaaagca atttatttga 7440
aaaatagcat ggaaaacaca catatatgca tgcttcttgc ttgaaatata gcttttagct 7500
tgaaataaac taaaactaaa tgcagaataa aatcattgca gctacctgat atgtatcatt 7560
ttaatatttg attctgtatt ctataagtat gactcatgtc tcgctggctt atctggtagc 7620
aaatctggac cctgtcagcc aacctgttgg tgggtggcagc tctgctaaac ctc 7673

<210> 16

<211> 37

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<221> modified amino acid

<222> (37)

<223> Leucine amide

<220>

<223> CRSP-3

<400> 16

Ser Cys Asn Thr Ala Ile Cys Val Thr His Lys Met Ala Gly Trp Leu

1

5

10

15

Ser Arg Ser Gly Ser Val Val Lys Asn Asn Phe Met Pro Ile Asn Met

20

25

30

Gly Ser Lys Val Leu

35

<210> 17

<211> 685

<212> DNA

<213> Swine

<220>

<223> CRSP-3 cDNA

<400> 17

gcccagctta cgtctccttt ctccgccagt gccatcacct gccaccagcg cggttgttgc 60
 ttctcccact tgggctccaa gctacctggt tcctgcatcc agagggggcac catgggcttc 120
 tggaagttcc ccccttctct gatcctcagc atcctgggtcc tgtaccaagc aggaatgctc 180
 catgccgcgc cattcaggat ggctttggga agcagctttg attctgccac actcacggaa 240
 gaggaaatgt ccttcctact ggttgcaatg gtgaaggatt atgtgcagat gaaggccact 300
 gtgctggagc aggagacaga ggacttcagc atcaccaccc aggagagatc ctgcaacact 360
 gccatctgtg tgaccacaaa gatggcaggc tggctgagca gatctgggag cgtgggtaag 420
 aacaacttca tgcccatcaa catgggctcc aaagtcttgg gccggcgccg cagacagcct 480
 caggcctgag ctgtgaaatg actctaaaaa gaagttgaac tcaagttgct ttcactgcaa 540
 agttgctttc cctgcaaatt aaaagaacca atttgaaaaa tagcatggaa gacacacata 600
 tatgcatgct tcttgcttga aatacaactt tttgcttgaa acaaactaaa cctaaatgca 660
 gaataaaatc attgcagtta cctga 685

<210> 18

<211> 125

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<223> precursor peptide of CRSP-3

<400> 18

Met Gly Phe Trp Lys Phe Pro Pro Phe Leu Ile Leu Ser Ile Leu Val

1

5

10

15

Leu Tyr Gln Ala Gly Met Leu His Ala Ala Pro Phe Arg Met Ala Leu

20

25

30

Gly Ser Ser Phe Asp Ser Ala Thr Leu Thr Glu Glu Glu Met Ser Leu

35

40

45

Leu Leu Val Ala Met Val Lys Asp Tyr Val Gln Met Lys Ala Thr Val

50

55

60

Leu Glu Gln Glu Thr Glu Asp Phe Ser Ile Thr Thr Gln Glu Arg Ser

65

70

75

80

Cys Asn Thr Ala Ile Cys Val Thr His Lys Met Ala Gly Trp Leu Ser

85

90

95

Arg Ser Gly Ser Val Val Lys Asn Asn Phe Met Pro Ile Asn Met Gly

100

105

110

Ser Lys Val Leu Gly Arg Arg Arg Arg Gln Pro Gln Ala

115

120

125

<210> 19

<211> 33

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<221> modified amino acid

<222> (33)

<223> Serine amide

<220>

<221> modified amino acid

<222> (1)

<223> pyroglutamic acid

<220>

<223> CT-2

<400> 19

Glu Cys Asn Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Thr Tyr Thr Trp Asp

1 5 10 15

Val Asn Lys Phe Tyr Ala Phe Pro Leu Thr Thr Thr Gly Ile Arg Val

20 25 30

Ser

<210> 20

<211> 802

<212> DNA

<213> Swine

<220>

<223> CT-2 cDNA

<400> 20

gccagctta cgtctccttt ctccgccagt gccatcacct gccaccagcg cgttgtttgc 60

ttctcccact tgggctccaa gctacctggt tcctgcatcc agaggggcac catgggcttc 120
 tggaagtcc ccccttcct gatcctcagc atcctgggtcc tgtaccaagc aggaatgctc 180
 catgccgcgc cattcaggat ggctttggga agcagctttg attctgccac actcacggaa 240
 gaggaatgt ccctcctact ggttgcaatg gtgaaggatt atgtgcagat gaaggccact 300
 gtgctggagc aggagacaga ggacttcagc ctggacagct ccagagctaa gcagtgcaat 360
 aatctgagta cctgtgtgct gggaacatat acatgggacg tcaacaagtt ttatgcattc 420
 cccttaacta caactgggat tagagtatct ggcaagaaat gggtcagggc cagagtctca 480
 gagaaagtcc attatccctc aaggcagcat accctaaggt gcttaagaag gccccaccc 540
 ctctccttt ctagttcctc tcctagaatt tgcattgtgtt cttctctggt tgctctctga 600
 gctgctatca gcagctttcc ttgtggccat ggatgtctgg aatatcagag aggaggtggg 660
 ggggtgggggc aggcaggcca gaagaaaatc actcaggaat agattaggag agaatgggca 720
 gccctgtgag tgcctgtgga tttcacagca gagcttctca gtcctgcttc tgaacatgct 780
 tttcactagg gaataaaagt at 802

<210> 21

<211> 162

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<223> precursor peptide of CT-2

<400> 21

Met Gly Phe Trp Lys Phe Pro Pro Phe Leu Ile Leu Ser Ile Leu Val

1

5

10

15

Leu Tyr Gln Ala Gly Met Leu His Ala Ala Pro Phe Arg Met Ala Leu

20

25

30

Gly Ser Ser Phe Asp Ser Ala Thr Leu Thr Glu Glu Glu Met Ser Leu

35

40

45

Leu Leu Val Ala Met Val Lys Asp Tyr Val Gln Met Lys Ala Thr Val

50

55

60

Leu Glu Gln Glu Thr Glu Asp Phe Ser Leu Asp Ser Ser Arg Ala Lys

65

70

75

80

Gln Cys Asn Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Thr Tyr Thr Trp Asp

85

90

95

Val Asn Lys Phe Tyr Ala Phe Pro Leu Thr Thr Thr Gly Ile Arg Val

100

105

110

Ser Gly Lys Lys Trp Val Arg Ala Arg Val Ser Glu Lys Val His Tyr

115

120

125

Pro Ser Arg Gln His Thr Leu Arg Cys Leu Arg Arg Pro Pro Pro Leu

130

135

140

Leu Leu Ser Ser Ser Ser Pro Arg Ile Cys Met Cys Ser Ser Leu Val

145

150

155

160

Ala Leu

<210> 22

<211> 7142

<212> DNA

<213> Swine

<220>

<223> gene of CRSP-3 and CT-2

<400> 22

taccgggecc cccctcgagg tcgacggtat cgataagctt gatatcgaat tcctgcagcc 60
cgggggatcc ttaaccaact gagggaggcc agggattgaa ctgcgccctc atggatacta 120
gtccggtttg ttacacctca gcaacgggaa cccccctggt cactttgaag agggttttca 180
tacagatcct cccacctccg ctatcagtga cctcaatgcg aatacaagtg cgggtggttct 240
gttaaattct ccaggttccg gaagcaagta ccgacataat cctcttgggg ctcaggattt 300
ttccccctcat tggttgcctg gagttccagg accaccctgg attcacagca gcgggaataa 360
gagcagctgc tgggtgctgag aggcattaga agcactgccc agcttacgtc tcctttctcc 420
gccagtgcc aacactgcc ccagcgcggt tgttgcttct ccacttggg ctccaagcta 480
cctggttctt gcatccaggt aagtccaaag attctgctta gctgtgattc tatttcttct 540
ctccctctcc tccccctcat ttctctccca ttacttttcc ttgccggtct cagaggctct 600
atccatttcc ctccggagtc cttcatcact caatctatta cgcgatttat ctccgggtcc 660
tttaacaggt aacactaaac ggtctcagtt ccagacactg agtctggctc cagttttgcg 720
gtctctctgcc gcatatgtgc ttaggttaat ctcaggaagc tggagcttcc tcaagcaatg 780
cgggctgagc agaacgcaga atatctttgt gtagaccgtg agctcaggga aaccctcttg 840
tgcctagctg tctgcgggaa atagactcat tttggaatgg attcggaact tagaccaggg 900
gaagcgggtg gcaaatagat gcaaagactg aggggcaggg agccattcaa ctgcaagtcc 960
tagctgccag tttggggagt tttttggttg tttttttctc ccagtttaa gtcctgtgtc 1020
ctaatttaag attccaccag cttgtttttt acagggtact ctttgccaaa gtttgaagca 1080
gctgagcagt agaatttggg tcttcagttt ctcagtgatt ctaaccacag agatatgtcc 1140
tcccaatccc cctccccctgc cagctatgag caaaagcctg gttcctggaa gacaactctg 1200

ggttgcatta tgtgaaaagc tgtggtggct tactccgagt ttgtcctcca ggagtcttgg 1260
ccaagagggt gcaggtgaga gagtgtgtgg tactggggag ggggcaatgg actgagacca 1320
cctcaccag atgttctggt aggtttcttt gctaaaccaa gcatgctgca agcgcaactgg 1380
atatctcagc agtgcacttg gctgaggaga aaatgatggt gaactgaaat gatatgacca 1440
gcctgaagcc aagaaaccag ggagttagag gcagaggcag gagcagaatc cagggtctgt 1500
aggctcatag aacttggaaac tcctacaggt ggtgacatta ttcttccctt gcagaggggc 1560
accatgggct tctggaagtt ccccccttc ctgacctca gcatcctggt cctgtaccaa 1620
gcaggaatgc tccatgccgc gccattcagg taagccagcc ctgccaggag ccctctcacc 1680
tccctcaacc cctgaaatct tagagtctg tgttgagtgg tactatgctg aatatggctc 1740
tctgtggggt tgtgggggtg tggggtcctg atgtacgaat gtaaacttgt atacaagtta 1800
atcagaaatg ttttaggagg ctatgtatca caaagttac aaataaacia aatatatagt 1860
acttgttatt tcatataacg cactgaacct cacagcatgc tgctattgct ttttctcaaa 1920
catttgtagc tttagcaaac ctatttacta atttcacat actttgagca gtgggttaca 1980
tcctaactg ctaattactt taccaataaa tttgttatta aatgtgatat gtggtccata 2040
catctaattt cttaccctca ttcaaattat attaagataa atattttcat attcaaacta 2100
tcattatcat ttattgttta ataattgctg tatttaacac taagctcata cagttcctga 2160
aaattacat cagctttcaa aagcctatat gatccacctc cagcaaacct cttcttttag 2220
gtcacctag agcctaactc gtggtgaagc agcatttttg catgaatact ggctcatgt 2280
cctgtctgtt gagtttgggt ggccacatcc tcagtgaag tggcagaaat gaggagtagg 2340
ggttggggta ggctcagcac atgttgggtt tgcttccctt cccaggatg gctttgggaa 2400
gcagctttga ttctgccaca ctacggaag aggaaatgtc cctcctactg gttgcaatgg 2460
tgaaggatta tgtgcagatg aaggccactg tgctggagca ggagacagag gacttcaggt 2520
cagtctctgc accctccca gaatatggt taccctctcc cctggagtac caggaaggca 2580
tgcgctgtg catgcacatg cacactcaca cacacaggta ggagagagca cagctagaca 2640
ggcagcctgg ggcacaactc ttctacaggc tccactaaaa tcataggtca tgtggaagaa 2700
ccacagataa aaacattcct ttctgaaagc agtaggggaa gccgtgagat cacctacagt 2760
ggaaattttg tagcagtact tgggagacct cccagcactg gagtttagcc ttgtaaggta 2820
aagccaggga atgaatctca tgtatctcag gagattttag aaatttggt ccttctcgtt 2880
aacctgccca tgatattctt tcacacctgc aaggcatctt cattgcacat ttgcaagggt 2940

aagccagagc acttagaaaa gatgagtcag gtagagcagt ttctgaaata ggtctgaggc 3000
ctttagatgt gtagaatctg tggagatgtg catgtttctca tggggccaga cacctttctc 3060
cagtcccaac tctctgtgca ctgagtttac tgttcatacc agctcctgac cgagctgtac 3120
ctgggcagag gcatgtgctg cacctttatc cgctctaaga acctctgtgc agagcataaa 3180
ggtctgagca gcatgtggaa tgccagaaaa ggtcgtccct cccaccaca gcccttcccc 3240
acatgccct ggctcagtga acctctgcat cctcctaata gaggatgcat gagccgccct 3300
cctgcttgcc cctcctgcc tctgttccag gtccccctc cctgggtctaa ccttctgcat 3360
gactgccctt gggggcagcc ctgggtgcatg gtattgtctg gcatgtcttt tccctgcagc 3420
ctggacagct ccagagctaa gcagtgcaat aatctgagta cctgtgtgct gggaacatat 3480
acatgggacg tcaacaagtt ttatgcattc cccttaacta caactgggat tagagtatct 3540
ggcaagaaat gggtcagggc cagagtctca gagaaagtcc attatccctc aaggcagcat 3600
accctaaggt gcttaagaag gccccaccc ctctctctt ctagttctc tctagaatt 3660
tgcatgtgtt cttctctggt tgctctctga gctgctatca gcagctttcc ttgtggccat 3720
ggatgtctgg aatatcagag aggaggtggg ggggtggggc aggcaggcca gaagaaaatc 3780
actcaggaat agattaggag agaatgggca gccctgtgag tgcctgtgga tttcacagca 3840
gagcttctca gtcctgcttc tgaacatgct tttcactagg gaataaaagt atgtttctaa 3900
aaacacctga gctatagtgg ccatgtcaca tgcttcatgg atacagagac ttgtctgtca 3960
agtagcctta gtcctgggta gctggagtca gggcatggtg ggtgggtccct ggagcaacct 4020
caagttgcaa aatcaggagc actaaggaa aaaacaagca cctctgggac ttgatgtac 4080
aaactcactt cctcttgag gaagacaggg gaactttcct ttttctaagg agtactcagt 4140
acctctgaat gggaggcacc ttccagacaa gtccttaaga atggggttgg gtgtgccacc 4200
aaaatctctc tatgtcttgg ttaaatttta gtttacttgt acagaaaaga ttggctgtta 4260
aagttctgtg ttccttggt tggtgcccag agcacattg ggttttctga cacctctgga 4320
aatgtctatg gagagtgatg atggcattc cccaaaagcc ctatggttt ctgttgggat 4380
tttgtgtta gcagaaacat ttcaggttca ctgggtccctc tcagagctat aattttccac 4440
ggatggtcag tcctgggggg aagcacctgc cctcaggctc tctactgacag gccttctctt 4500
tgtctccatc ctgaaaatca gcatcaccac ccaggagaga tcctgcaaca ctgccatctg 4560
tgtgaccac aagatggcag gctggctgag cagatctggg agcgtgggtta agaacaactt 4620
catgcccac aacatgggct ccaaagtctt gggccggcgc cgcagacagc ctgaggcctg 4680

agctgtgaaa tgactctaaa aagaagggtga ctgctctaga acctggggta gcagggcaaa 4740
 tggctgggta ttgcagaggt gctggccaca ctctaaccit ccgtgggcct gtattataaa 4800
 aacatccaca gcaaaagggc caaccctagt gtccagagaa agaacagggt cccaagagct 4860
 gaaatcccta gaatttggaa tcacttctat ttttttcagt ttctcccagt gattctgaga 4920
 tcactgcaa ggaaatatag atcctatgaa tttaaaacac tgttccctgc acttacaatt 4980
 gccattgtag gttttgagtt ttaaaggtaa tgatcctatc caatgagttt gaagtatatc 5040
 gtacaatgtc acgtacacct gaattcagag catagacttg gtttcaaagtg tgatgtctgt 5100
 cctctactaa ctatatgacc atgggccagg ccctctctgc gtctcagcct ctacatgtaa 5160
 ttttaaggca aaaacagtat ctacctgtta ttgttaatat aaaaagtaat tgagataatt 5220
 catggcaaga gcctcaacat taataaataa taatatacta gctcttggtt tttttttctc 5280
 ctaggtcacc aagaagttga actcaagttg ctttactgc aaagttgctt tccctgcaaa 5340
 ttaaaagaac caatttgaag aatagcatgg aagacacaca tatatgcatg cttcttgctt 5400
 gaaatacaac tttttgcttg aaacaaacta aacctaaatg cagaataaaa tcattgcagt 5460
 tacctgatgt gtatcttttt aatatttgat tctgtattct gtaagtatga ctcatgtctc 5520
 actggcttat ctggtagcaa atctggaccc tgtcagccaa cctgttggtg gtggcagctc 5580
 tgctaaacct caggagcaca tgaaattgct gccctatggg tgtctgggga tgcacagaaa 5640
 tgttgagcct cagtgggaacc tttaaagaaa tggctctgga attcccatca tagctcagt 5700
 gaagcaaadc tgaccagcat cgataaggat gccggttga tccatggcct tgcccattgg 5760
 gtcaaggata tgttggtgcc atgagctgtg gtataggtaa caggcgcagc tcagatctgg 5820
 cattgctgtg gctgtggtat aggccagcag ctgcagctcc gattcaaccg ctaccctggg 5880
 aacctccatg tgctgcaggt gggccctaa aaagacagaa aaaaagaaga gaaaaaaaaa 5940
 tgttctcatt tgttcacttc atcaagccag aaaatgtatt ttcagtacac ttaaaaggag 6000
 tccctgctgc tatttatgct gtttccccca taagaacctc agggacctgt gaacacttgg 6060
 ttgaccaggt tgctcaaagtg aggcaatadc gtgcttgggg tgggtcctca gtatcctgta 6120
 ctctcagtgt ctagtgaaac atccttatgg gattagaatc ctctgcatct cagagagaca 6180
 ttcacattct cagagggcac cctgggtccc agccccagaa gttatctgtt ctctctctcc 6240
 ttgactcagg tttgccctta tccatccctg cctttcctcc ccaacagctc ctctttacac 6300
 atcctatagc ctgcaaaacc ctttagagca atggctcaca gcttgaaagg gtatcgaga 6360
 ctggcagacc tggaaaggct ctcatatgcc atctaatacca actttttact cttgaagttg 6420

cagagaagga aaattatggt gctcagggtc ctgcaataac tttatgagac atccctatat 6480
 ttaagaaata ataattgagt gtctgctatc tctttgacac tatttaagct ccaggaatag 6540
 agcaataaac agaacagaca aaacccctg cattcatgga gcttatattc taactggaag 6600
 agactgaggt gatacatgct ctggaattag aaacattcag cactggaagg aatctgggat 6660
 gtcataaggg tataaaggct tatttgatat agctatttca tgggatcaac atccctggca 6720
 tatgctggca atgctggtta ccatctgttg actatgactt ccaaggtgac tggacagcca 6780
 gtttcattgg tggacagtca attaagtggg atattttcca ttagagaagt catcccctac 6840
 tacctacaga ttatagttat ttcctaagaa gcacatagaa ttatgaccct tctcccattc 6900
 attctgtagt catcacagta acccaacctt agccataaag gtagatcaga ccatgtctcc 6960
 cttaggacag aatactctat tatagactcc ccttctcaca aagtaaacad tttaggcatt 7020
 gcagtgtctt cttaatcaac tctacttggt cagagtatat gtattaaaat ttacttccaa 7080
 atttgaatt ccctgggtgg taaggatcca ctagtcttag agcggccgcc accgcggtgg 7140
 ag 7142

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、本発明のペプチドの CRSP の構造を模式的に示すものである。

【図 2】

図 2 は、本発明のペプチドの CRSP (pCRSP) のアミノ酸配列と、ブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド (pCGRP-I)、ヒトカルシトニン遺伝子関連ペプチド I (hCGRP-I)、ヒトカルシトニン遺伝子関連ペプチド II (hCGRP-II)、ヒトアミリン (hAmylin)、ブタカルシトニン (pCT)、及びヒトアドレノメデュリン (hAM) のアミノ酸配列との比較を示すものである。

【図 3】

図 3 は、本発明のペプチドの CRSP の発現部位を調べるためにノーザンブロットティングを行った結果を示す図面に代わる写真である。図 3 中の矢印は、CR

SPの位置を示している。

【図4】

図4は、LLC-PK₁細胞を用いた本発明のペプチドのCRSPのcAMP産生活性を検討した結果を示すものである。図4の縦軸はcAMPの産生量($\text{pmol}/10^5\text{細胞}/30\text{分}$)を示し、横軸は各ペプチドの濃度の逆対数($-\log(\text{ペプチド濃度 (M)})$)を示す。図4の黒丸(●)は本発明のCRSPを示し、白丸(○)はブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド(pig CGRP)を示し、白菱形(◇)はブタカルシトニン(pig CT)をそれぞれ示す。

【図5】

図5は、LLC-PK₁細胞を用いた本発明のペプチドのCRSPによるEIPA非存在下でのナトリウムイオンの取り込み試験の結果を示すものである。図5の縦軸は各イオンの取り込み量(cpm)を示し、横軸に左端はコントロール(ペプチド無添加)を示し、その右は各濃度のCRSPを示す。***は $p < 0.001$ で有意差があったことを示す。

【図6】

図6は、LLC-PK₁細胞を用いた本発明のペプチドのCRSPによるEIPA存在下でのナトリウムイオンの取り込み試験の結果を示すものである。図6の縦軸は各イオンの取り込み量(cpm)を示し、横軸に左端はコントロール(ペプチド無添加)を示し、その右は各濃度のCRSPとEIPAを示す。***は $p < 0.001$ で有意差があったことを示す。

【図7】

図7は、LLC-PK₁細胞を用いた本発明のペプチドのCRSPによるカルシウムイオンの取り込み試験の結果を示すものである。図7の縦軸は各イオンの取り込み量(cpm)を示し、横軸に左端はコントロール(ペプチド無添加)を示し、その右はsCT(サケカルシトニン)及びCRSPを示す。*は $p < 0.05$ で、**は $p < 0.01$ で有意差があったことを示す。

【図8】

図8は、LLC-PK₁細胞における本発明のペプチドのCRSPによる細胞増殖に伴って合成されたDNA量の測定結果を示す。図8の縦軸は $^{125}\text{I-D}$

Uの取り込み量($\times 100 \text{ cpm}/\text{ウエル}$)を示し、横軸は各ペプチドの濃度の逆対数($-\log(\text{ペプチド濃度(M)})$)を示す。図8の黒丸(●)は本発明のCRSPを示し、白丸(O)はブタカルシトニン(ブタCT)を示し、白菱形(◇)はサケカルシトニン(サケCT)をそれぞれ示す。

【図9】

図9は、LLC-PK₁細胞における本発明のペプチドのCRSPによる細胞増殖に伴う細胞数を計数板にて計測結果を示す。図9の縦軸は細胞数($\times 1,000$ 細胞/ウエル)を示し、横軸は左端はコントロール(CRSP無添加)を示し、その右は各濃度のCRSPを示す。*印は $p < 0.05$ で有意差があったことを示す。

【図10】

図10は、遺伝子工学的にカルシトニン受容体を発現している細胞(COS-7)における本発明のペプチドのCRSP刺激によるcAMP産生能測定結果を示す。図10の縦軸はcAMPの産生量($\text{pmol}/\text{ウエル}/30\text{分}$)を示し、横軸は各ペプチド(リガンド)の濃度の逆対数($-\log(\text{リガンド濃度(M)})$)を示す。図10の黒丸(●)は本発明のCRSPを示し、白菱形(◇)はブタカルシトニン(pCT)をそれぞれ示す。

【図11】

図11は、ブタカルシトニン受容体(CTR)を発現させたオポッサム腎上皮細胞における本発明のペプチドのCRSP刺激によるcAMP産生能測定結果を示す。図11の縦軸はcAMPの産生量($\text{fmol}/\text{ウエル}/1\text{時間}$)を示し、横軸はCRSPの濃度の逆対数($-\log(\text{CRSP濃度(M)})$)を示す。図11の黒丸(●)はブタカルシトニン受容体(CTR)を導入したオポッサム腎上皮細胞の場合を示し、黒四角(■)はオポッサム腎上皮細胞(OK細胞)の場合を示す。

【図12】

図12は、ブタカルシトニン受容体(CTR)を発現させたオポッサム腎上皮細胞における本発明のペプチドのCRSP刺激によるナトリウムイオンの取り込み試験の結果を示す。図12の縦軸はナトリウムイオンの取り込み量の比(コン

トロールを100とする)を示し、横軸はCRSPの濃度の逆対数($-\log(\text{CRSP濃度(M)})$)を示す。図12の黒丸(●)はブタカルシトニン受容体(CTR)を導入したオボッサム腎上皮細胞の場合を示し、黒四角(■)はオボッサム腎上皮細胞(OK細胞)の場合を示す。図12中の***印は $p < 0.001$ で有意差があったことを示す。

【図13】

図13は、ラットにおける本発明のペプチドのCRSP投与による血中カルシウム濃度の変化を測定した結果を示す。図13の縦軸は血中カルシウム濃度(mM)を示し、横軸は時間(分)を示す。図13中の**印は $p < 0.01$ で有意差があったことを示す。

【図14】

図14は、ラットにおける本発明のペプチドのCRSP投与による血圧の変化を測定した結果を示す。図14の縦軸は血圧(mmHg)を示し、横軸は時間(分)を示す。

【図15】

図15は、ブタカルシトニン受容体(CTR)を哺乳類発現ベクターpcDNA3.1に導入し、アカゲザル腎細胞(COS-7)に発現させた細胞に対し、CRSP又はCRSP-Gly刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイにより測定した結果を示す。縦軸はcAMPの産生量(pmol/ウエル/130分)を示し、横軸はCRSPの濃度の逆対数($-\log(\text{CRSP濃度(M)})$)を示す。

【図16】

図16は、LLC-PK₁細胞を用いた本発明のペプチドのブタCRSP、ウシCRSP及びイヌCRSPのcAMP産生促進活性を検討した結果を示すものである。縦軸はcAMPの産生量(pmol/ウエル/10分)を示し、横軸はCRSPの濃度の逆対数($-\log(\text{CRSP濃度(M)})$)を示す。図16の(■)はブタCRSPを示し、(●)はウシCRSPを示し、(▲)はイヌCRSPをそれぞれ示す。

【図 17】

図 17 は、CRSP 遺伝子の塩基配列を示す。下線部がエクソンを示す。下線部の下に CRSP 遺伝子のコードするアミノ酸配列を示す。

【図 18】

図 18 は、CRSP-2 遺伝子の塩基配列の前半部分（1～3840 塩基）を示す。

【図 19】

図 19 は、CRSP-2 遺伝子の塩基配列の後半部分（3841～7673 塩基）を示す。下線部がエクソンを示す。下線部の下に CRSP-2 遺伝子のコードするアミノ酸配列を示す。

【図 20】

図 20 は、CRSP-2 の cDNA 塩基配列を示す。図 20 において、実線で囲まれた部分が成熟ペプチドで、灰色がアミドに変換されると推定されるグリシンを示す。

【図 21】

図 21 は、CRSP-3 の cDNA 塩基配列を示す。図 21 において、実線で囲まれた部分が成熟ペプチドで、灰色がアミドに変換されると推定されるグリシンを示す。

【図 22】

図 22 は、CT-2 の cDNA 塩基配列を示す。図 22 において、実線で囲まれた部分が成熟ペプチドで、灰色がアミドに変換されると推定されるグリシンを示す。図 22 における成熟体の N 末端側にあるグルタミンはピログルタミン酸に変換されると推定される。

【図 23】

図 23 は、各 CRSP と CGRP や AM、CT-2 と CT のアミノ酸の比較を行った図を示す。

本発明のペプチドの CRSP (pCRSP)、CRSP-2 (pCRSP-2)

、CRSP-3 (pCRSP-3)、CT-2 (pCT-2) のアミノ酸配列と、ブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド (pCGRP)、ブタカルシトニン (pCT)、及びブタアドレノメデュリン (pAM) のアミノ酸配列との比較を示すものである。

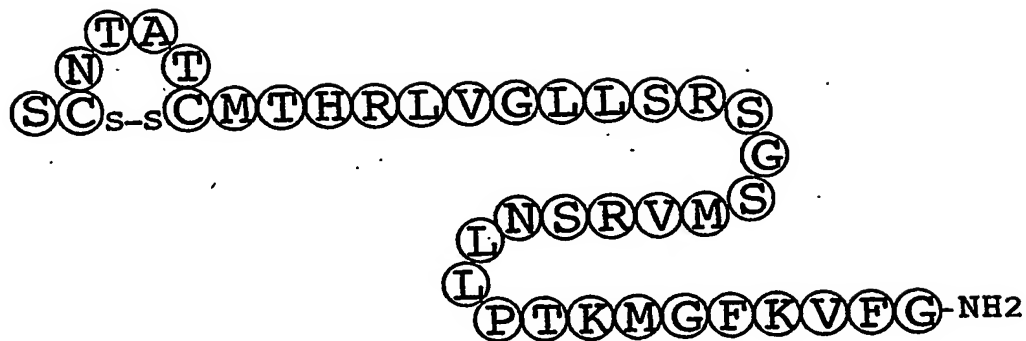
【図24】.

図24は、CRSP、CRSP-2、CRSP-3、CT-2、CT、CGRPの遺伝子発現量をRT-PCRにより高感度定量した結果を示す。図の縦軸に各種遺伝子を、横軸に遺伝子発現量を測定したブタの組織を示す。トータルRNA量の補正のためにGAPDH (グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素) の発現量についても測定した。

【書類名】

図面

【図1】

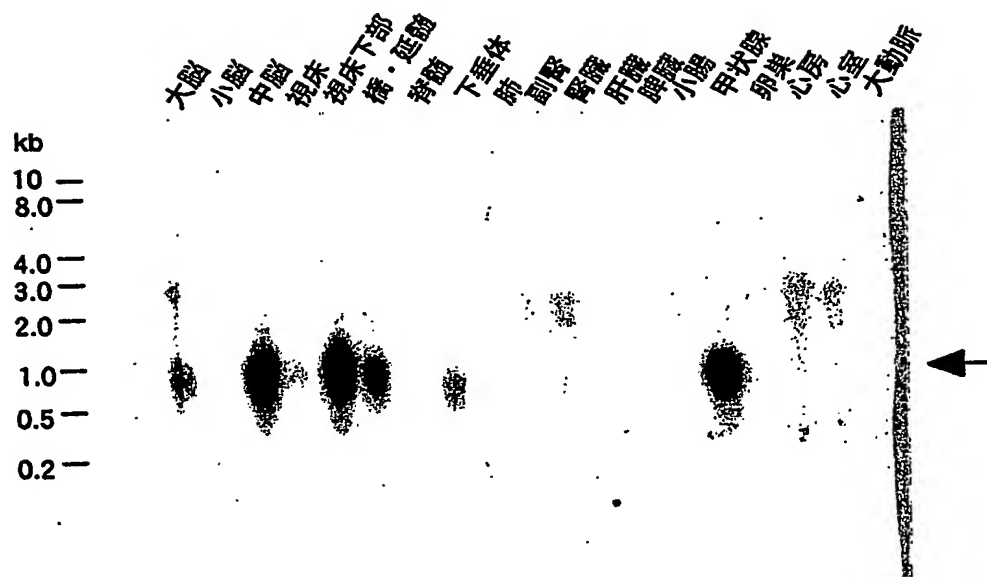


【図2】

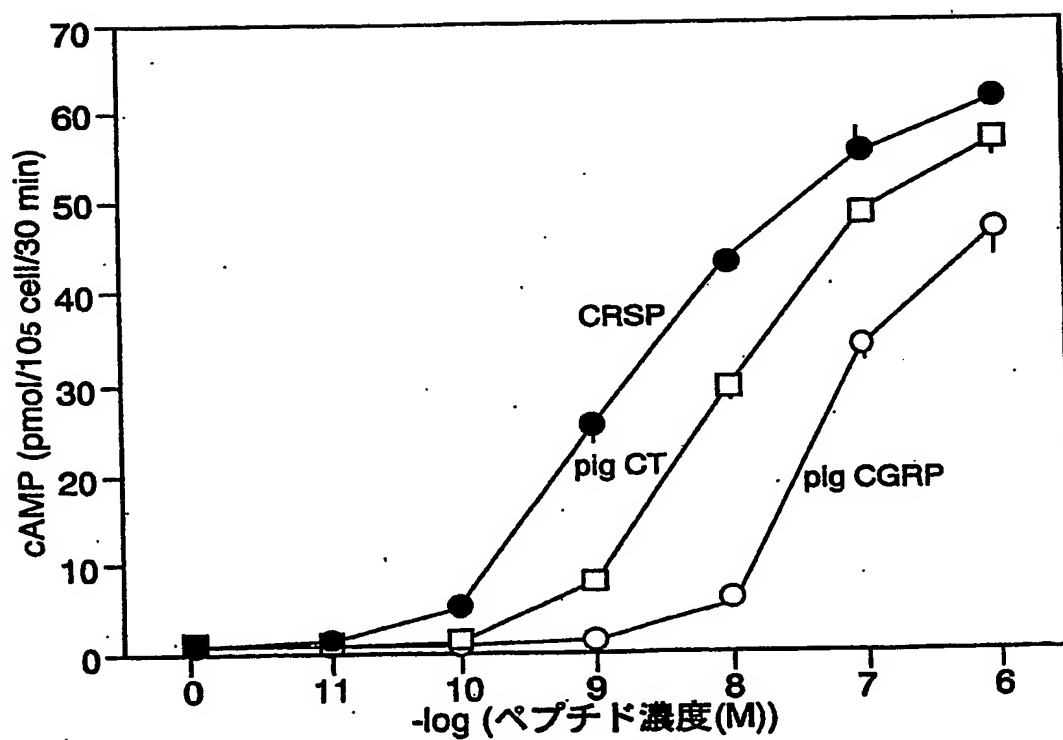
pCRSP
 pCGRP-I
 hCGRP-I
 hCGRP-II
 hAmylin
 pCT
 hAM

SCNTATCMTHRI VGLLSRSGSMVR SNLIPTKMGFKVFG-NB2
 SCNTATCVTHRIAGLLSRSGGMVKSNFVP TDVGSEAF-NB2
 ACNTATCVTHRIAGLLSRSGGMVKSNFVP TDVGSKAF-NB2
 ACNTATCVTHRIAGLLSRSGGMVKSNFVP TDVGSKAF-NB2
 KCNTATCATQRIANFVHSSNNFGAILSSINVSNTY-NB2
 CSNLSTCVLSAYWRNLNNFHRFSGMGFGHETP-NB2
 YRQSMNMFQGLRSFGQRFQGTQVQKLAHQIYQFTDKDKDNVAERSKISPOGY-NB2

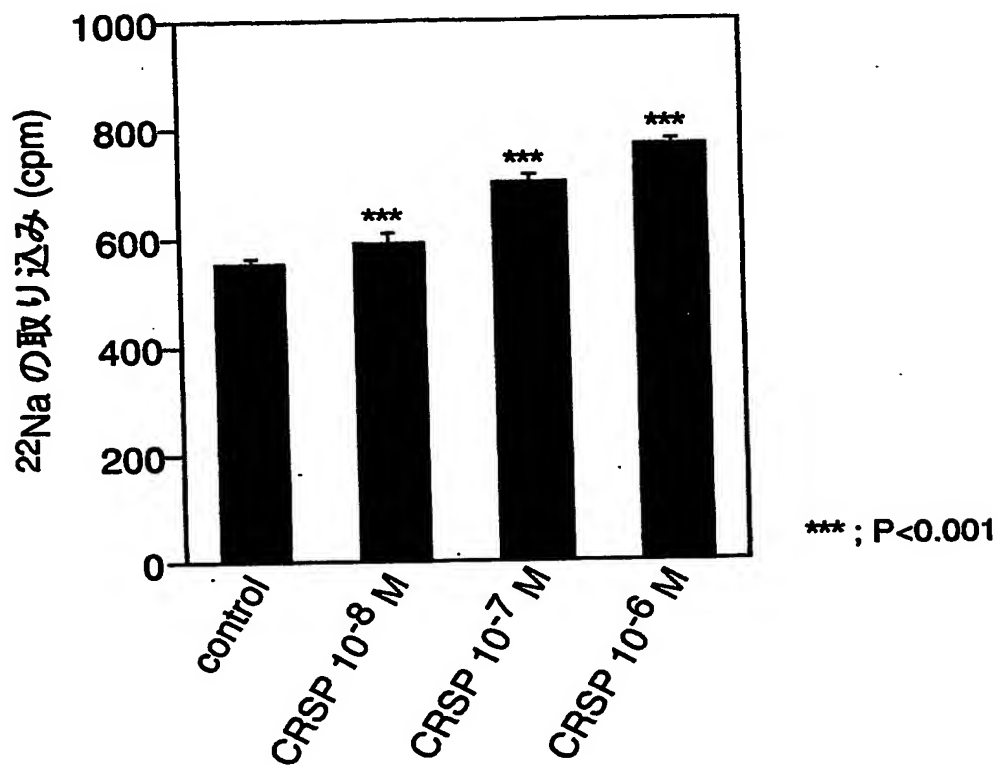
【図 3】



【図 4】

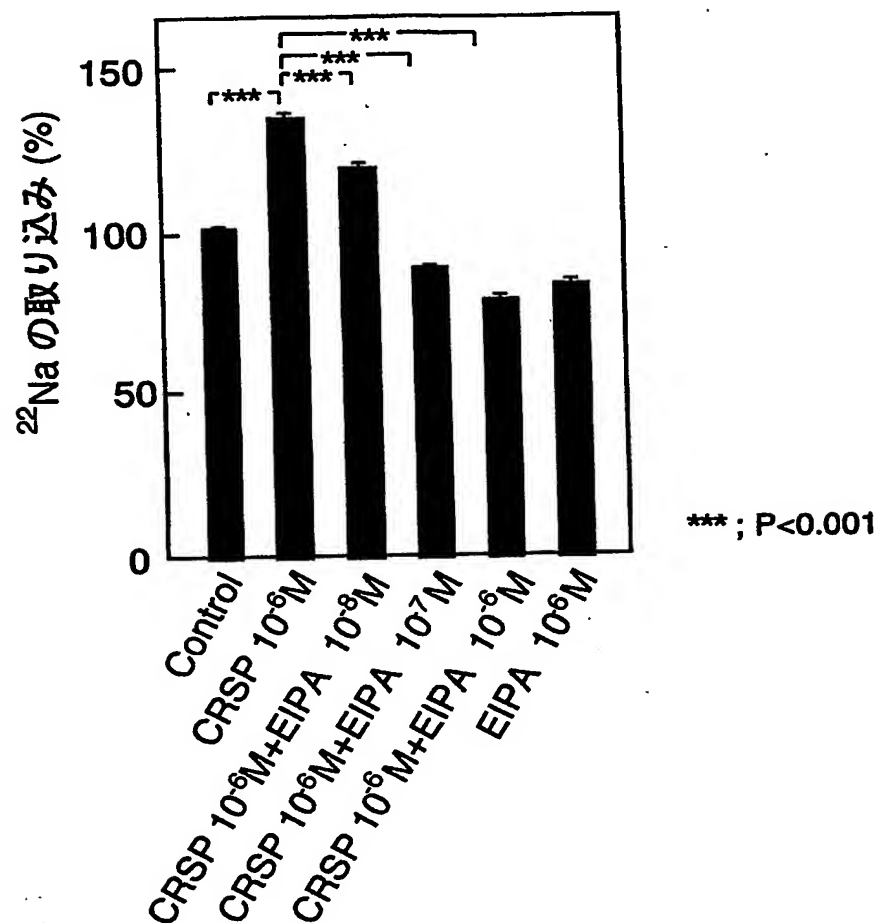


【図5】

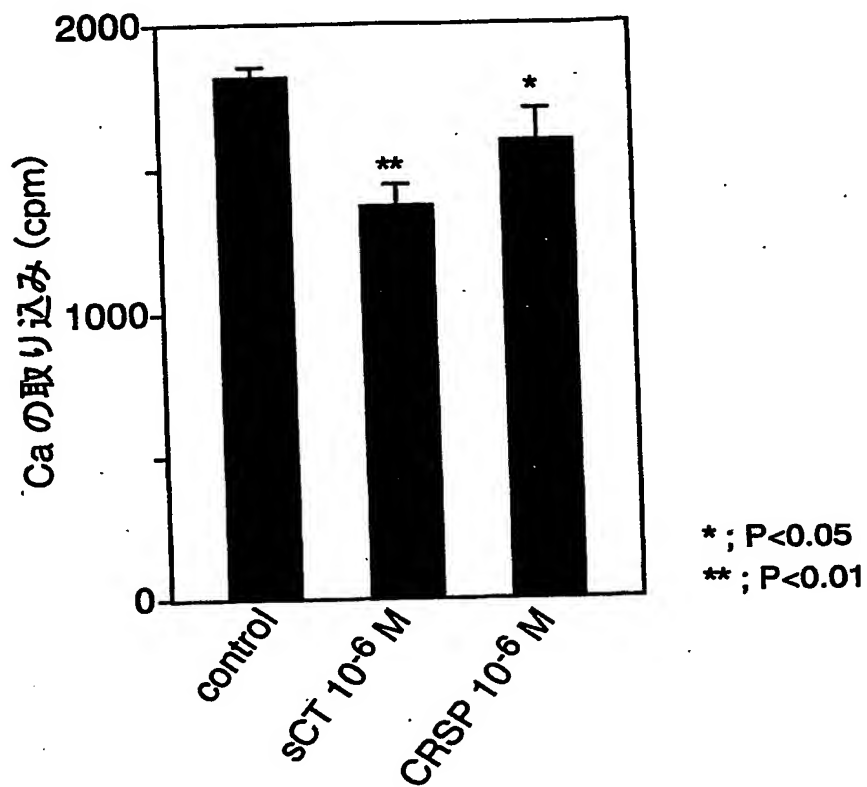
CRSP 刺激による ^{22}Na の取り込みの変化

【図6】

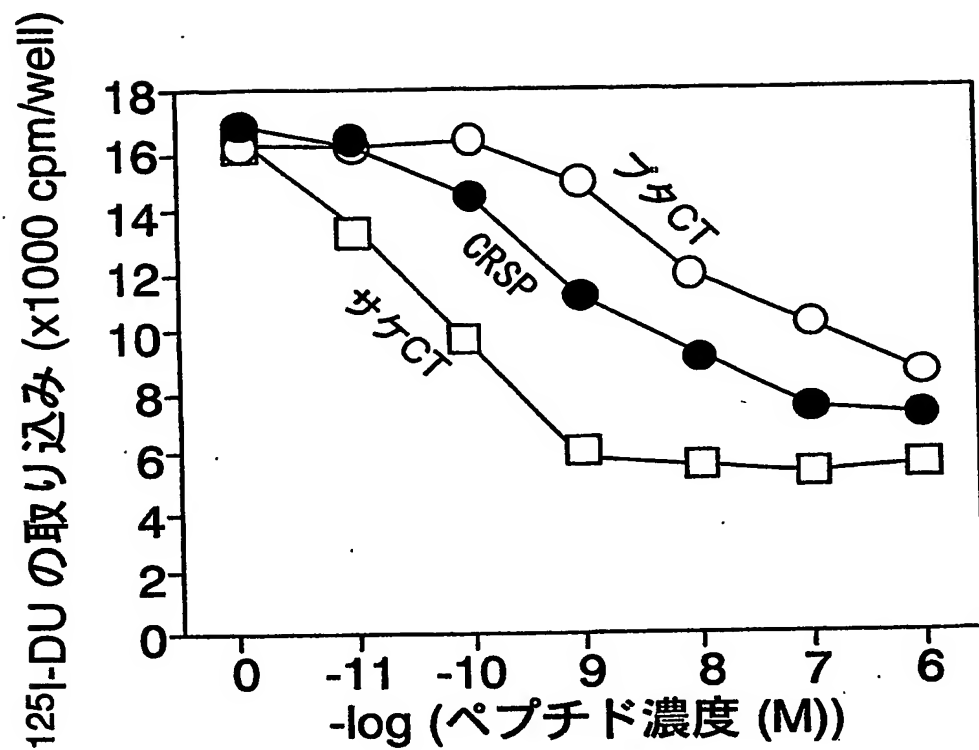
EIPA(アミロライド誘導体)によるNa取り込み上昇の阻害



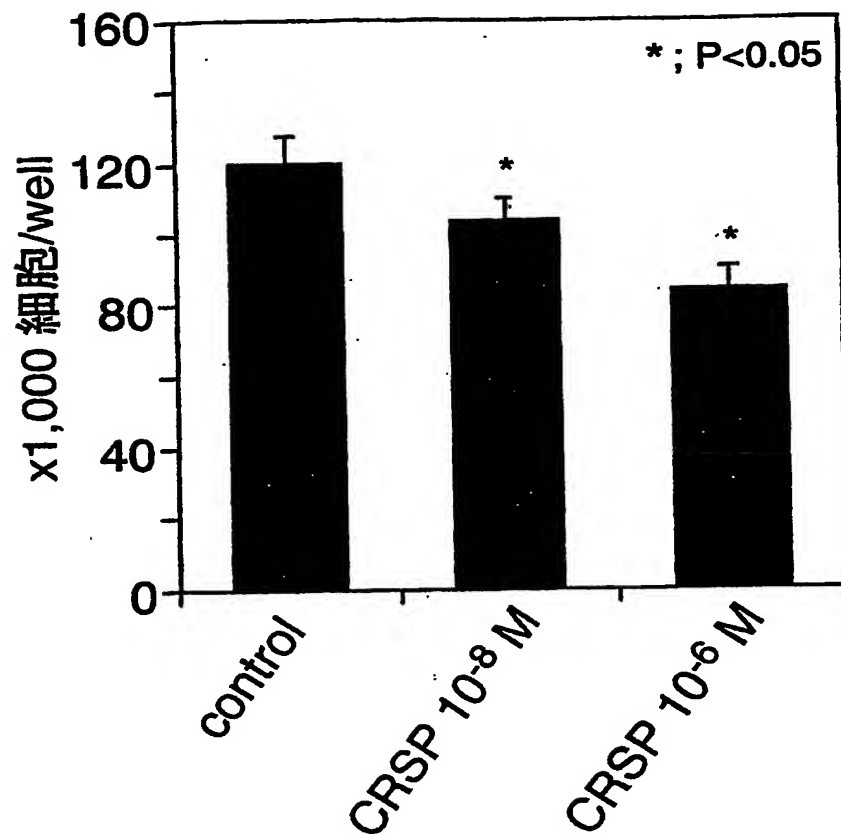
【図 7】

CRSP 刺激による ^{45}Ca の取り込みの変化

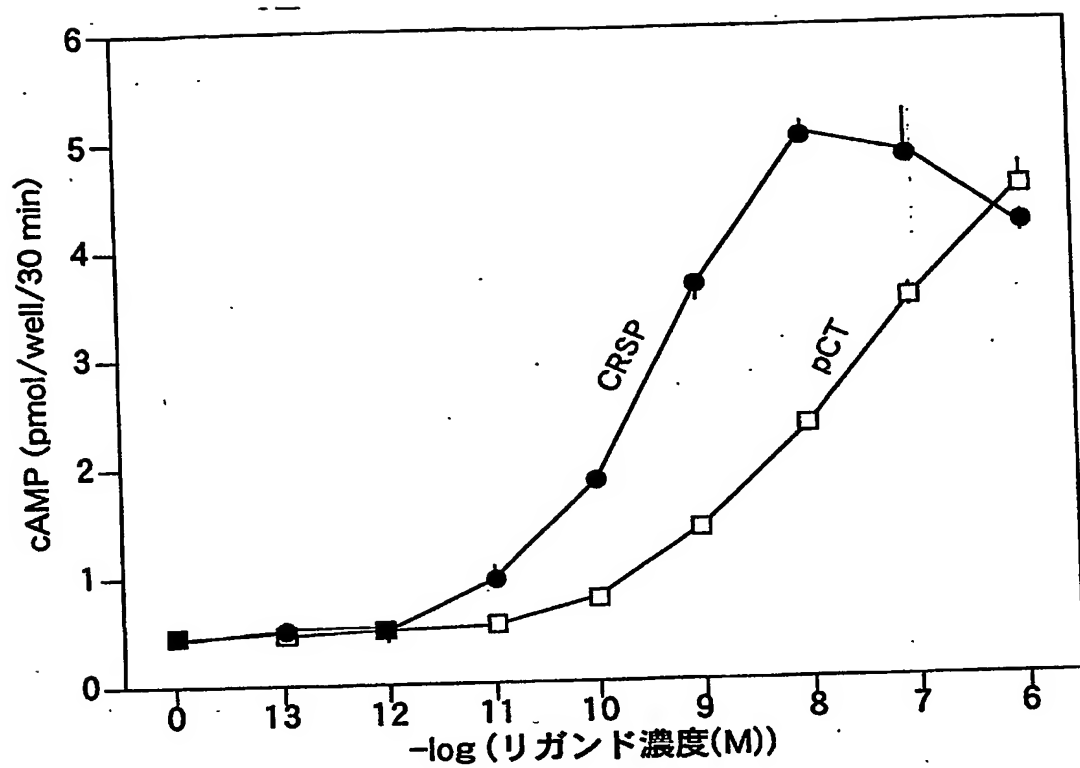
【図 8】



【図9】

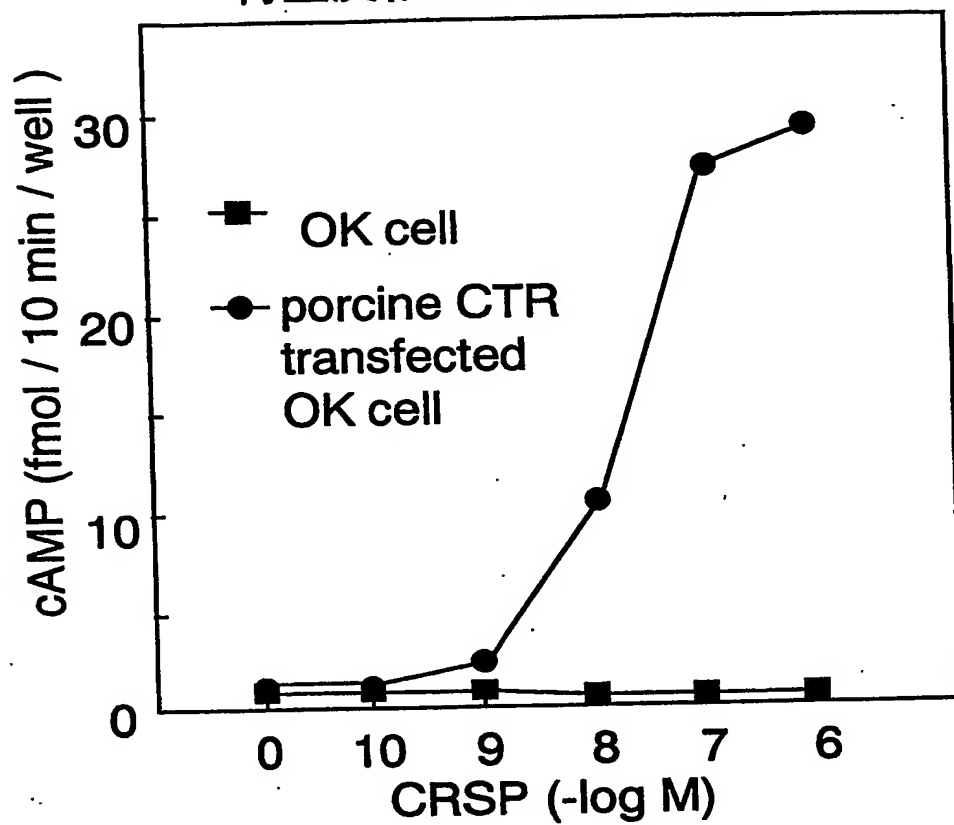


【図10】



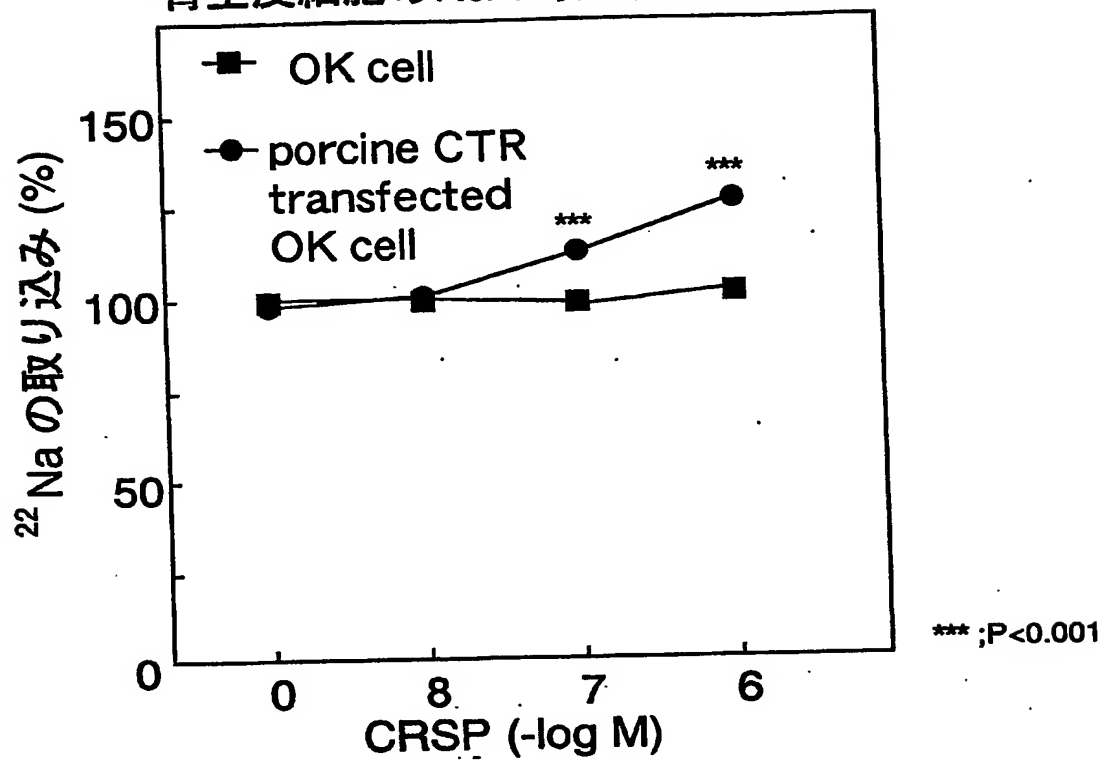
【図 11】

ブタCTRを発現させたオポッサム
腎上皮細胞のcAMPの上昇

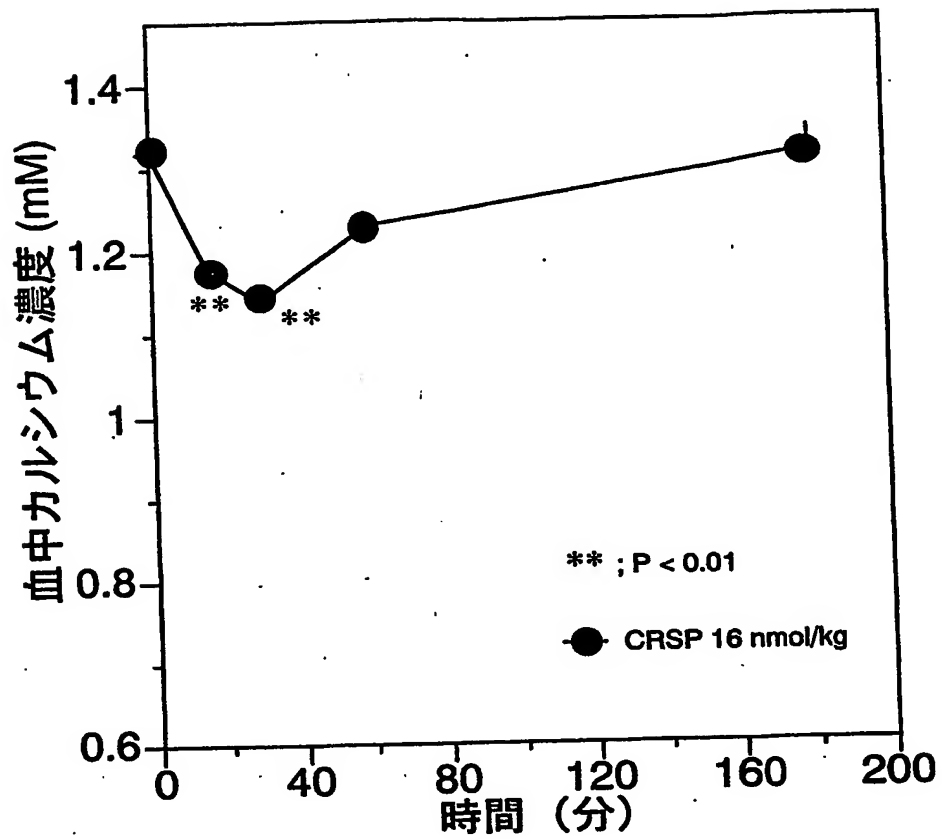


【図12】

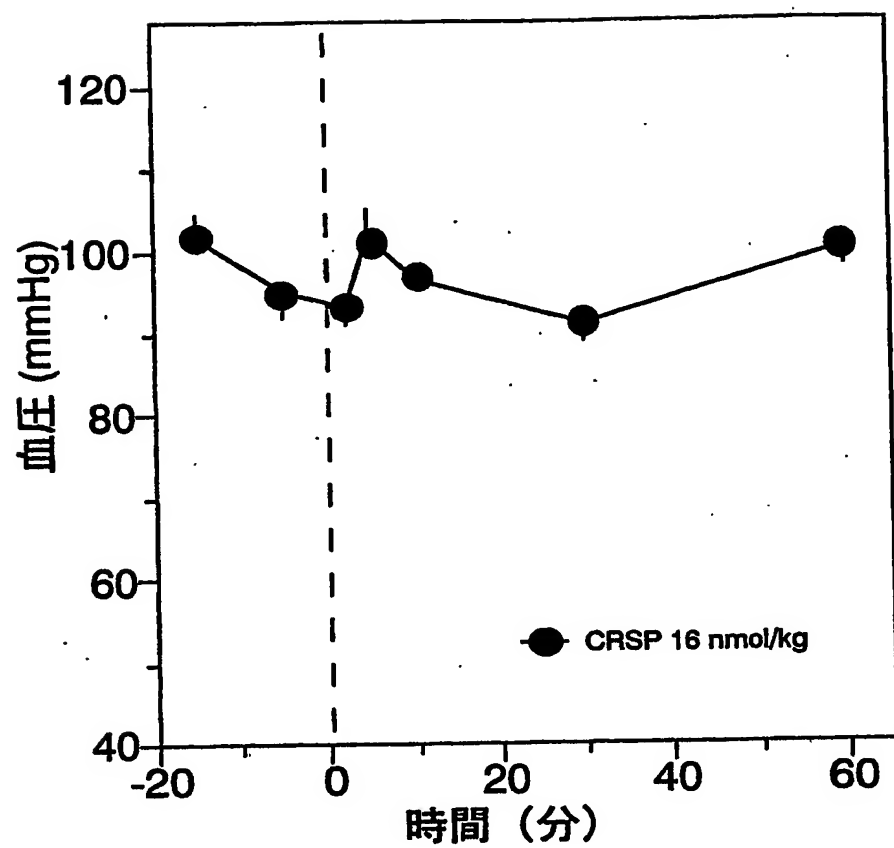
ブタCTRを発現させたオポッサム
腎上皮細胞のNaの取り込みの上昇



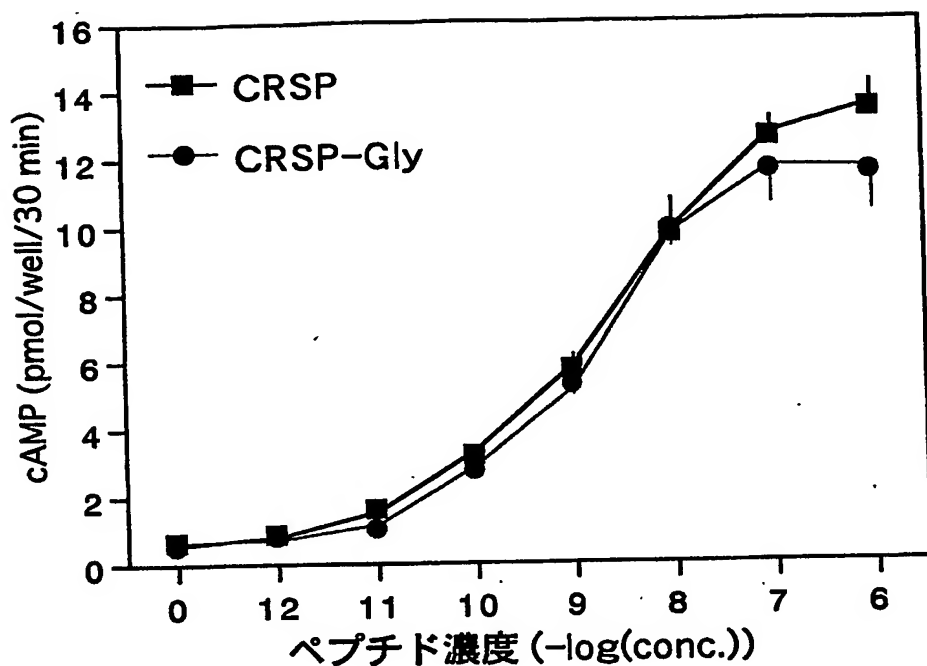
【図13】



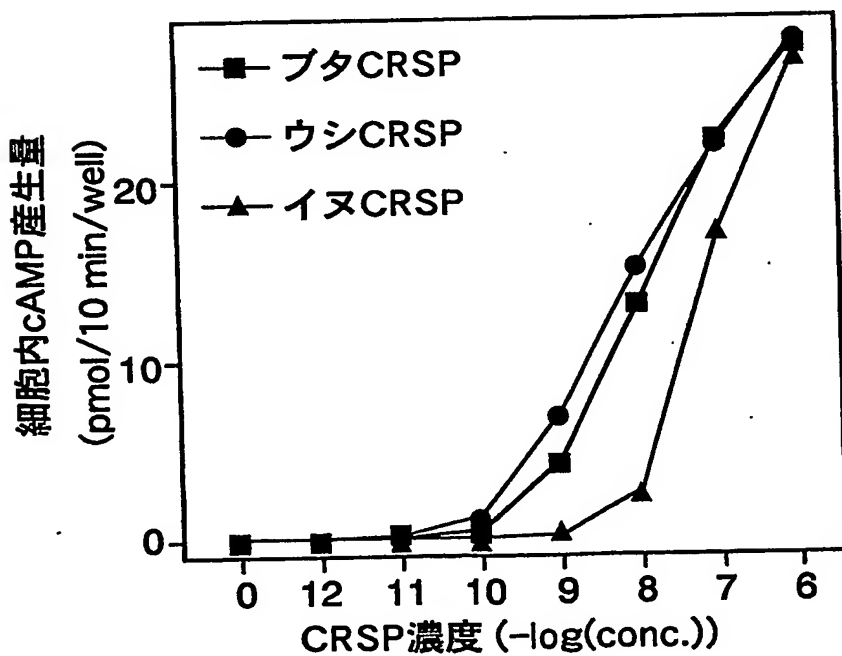
【図14】



【図15】



【図16】



【図17】

CTCGAGGATCCTGCCTCTTGTTCCTCCCAAAATCCTGCCCTTCCTGTGCTTGATTCCAGCTG 60
 CCTGAATCAGACCCCTGCCTTGGGACAGAAATCATCAACCTGCTGCGCATTAACCTCCCA 120
 AACCCGCACTTGGACATGGTAGTCTTATAGGGGACCGGGATGCCTTGTAAATGCTGGACTCTG 180
 CTCTACAAAGATCACATAGCTGGGGATGGAGAGGATGTGAGCCTCGGAAACCGAACAGG 240
 TAAAGTTTACCATGACGTCAAACTGTCCTTAAATTCCTGCTCACTTTGCGTGTGTTTTC 300
 GTTGGTGCACCAACCTCCCAACCCCTCCCAACCCCGCCATCAATGACCTCAATGCAA 360
 ATACAAGTGGGGTGGTCTGTGGATGCTCCAGGTTCTGGACGCAAGTAGTGACACAATC 420
 CTGGGGCTCAGGATCTTTCCTCTCATTTGGTTGCCCTGGAGCTCTGGGACCAACCCAGATTC 480
 AGAGCGGCGGGAATAAGAGCAGCTGCTGGTGGGGAAGGTTTAGAGGCACTACCCACCT 540
 CAAGTGTCTCTGCCGCTTCTTCCACAGTGCCTATCGCTGACGCCAACGCTGCTGCCCTCTG 600
 CTCCCTCTCTGCTCCAGTCCACCTGGTTCTCTGCTGCCCGGTAAGCCCGGAGATTCTCTG 660
 TAAGCTGTGGTTCTGTTTCTCTCTCCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 720
 CTAGCTGATCTCTTTTCCCGTCTCAAAGTTCTCTGCTCACTTCTCTCTGGGTCTCTTCAT 780
 CCTGTAATATGCTTACCTGCGCAATTCATTCTAGGCTCTCTTCAAGGTAACCTCTGGATG 840
 GTCTCAGTTCTGGGGATTCCCTGCTCTACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 900
 CCCCAGCAGACGTGCTTGGTCCGTTGGGATTGGAGCTCTCCAGGCACTTCAGG 960
 GAGAGGAGGATGAGGAATAGCTTTGAGCAGAGAACTTTTCATGATCCCATCTCTCT 1020
 TACCTACAAGGATCGCTGGAAATGGGGTCGGGACCTGGGACAGTGCATGAGGTGGGCAA 1080
 TAGGTGCAATGACTGAGGGGAAAGTAGCTATTAAACGCAAGCCCACTTGAAGGTTCTGG 1140
 GAACTCCCCCTCCCGCACCGCCACCCCATTTAATCTTGGGTCCCAATTTAAGGCTGTACC 1200
 AGCTTGTCTCTTACAGGTTGCTCTTTGGCCAGAGTATGGAGCAGCTGGACAGTAAATTTG 1260
 GTTCTTCAGTTTCTCAGGATTCACATGCAAGATATGCTCTCCCACTCCCTTCCCT 1320
 CCAGCCAGGTATAGCAAAATCAGGCAATCAGGAGAGATGCTGATGGGTGCACTATGGG 1380
 AAAAGCTGTGGTGACAGGTACTGCGAGTCTGCTCTCCAGGAGTCCCGGCAACAGGTTGA 1440
 AGGTGAGAGTGTGGGTGTCTGGGAGGGGGCTATGGACGAGAGCTCTCACCAGTTG 1500
 TCCGTCTAGGCTTCTTTGCTTAAACCAAAACATGTTGAGGCTCACTGGATCTTCCAGCAGT 1560
 CCACCTGGCTGAGGAGGAATGATGCTGAAAGGAAGGACACAGCAGCTGAAAGCCAGG 1620
 AAGCCAGGAGTTGGAGGAGAGGAGGAGGAGGAGCCAGGTCGTGGGCTCAATGAACT 1680
 TGGAACTGCTACAGGTGGTGCATTTCTTCCCTTGCAAGGGGACCATGGGCTTCTG 1740
 MetGlyPheTr

GAAATTTCCGCCCTTCCTGGTTCTCAGCATCTCTGGTCTGTACAGGCAGGCATGTTCCA 1800
 pLysPheProProPheLeuValLeuSerIleLeuValLeuTyrGlnAlaGlyMetPheHi

CACAGCACCAATGAGGTAAGACAGCCCTGCCAACAGCACACTCACTTGATGAGAATGTA 1860
 sThrAlaProMetAr

ATATAAACGTTATATAAAATTTATTATAAGGTGGCTCTGTAGAACAATGGATAGTGCCTT 1920
 CGCCTCTATTAAGTTTATCATAAAGCTTTATGTGTACACAAAGTTTGTAAATAGACATAAG 1980
 ATATACAGTACTCATGATTGTAAATTTTATATACTTATCAAACCTCACAGCATGCTTTT 2040
 TTGTTTTCATCAAATATTTGTACCTTTAGCACACGTATATGCTCATATTACCATAATTTA 2100
 AGAAATGGATTGTATCAATTTGCCAAATACCTTTGCTAGTAAATTTGTTATTAATCTGA 2160
 TATGGGATCTACACATCTCATTTTTCACCTTTCATTCAACTGCATTAGCTTAAATTTATT 2220
 TTCCTATTCAAATATCAGAAACAGGCAACCTGGCTGTTTATCTTGGGGAGGGGAGG 2280
 AGGAGATCAGAACCTGTTTTTAGGCTTGCCTTCCCTCTCTTAGGCTCTGCTTTGGGAGCCC 2340
 gSerAlaPheGlySerPr

TTTTGATCCTGCTACCTCTCTGAGGAGGAATCACGCCTCCTTTTGGCTGCAATGGTGAA 2400
 oPheAspProAlaThrLeuSerGluGluGluSerArgLeuLeuLeuAlaAlaMetValAs

TGACTATGAGCAGATGAAGGCCCGTGAGATGCAGAAGCAGAGGGCACAGGGCTCCGGGTA 2460
 nAspTyrGluGlnMetLysAlaArgGluMetGlnLysGlnArgAlaGlnGlySerGI

AGGTTCCTGCCCAAGGACAACAGGGCATCCCTTTCTCTCTGCTGAGGCCCAGGAAGG 2520
 CATATTTTAAAGTCACTTTTGTAGTTTCTGACCCCTGACATGCTGTGGGATGATTA 2580
 TGGCATTTCCCTGACGCGCTAGGATTTCTGCTGTGATGACCTTTTCTAGCAGAAATAC 2640
 TCAAGGTTCACTGCTCTCTCAGGCAAGGAGTAGTCTTCCATGACGATTTCTGCTACAGCAC 2700
 CTGCACTCAACCTCTCACTGACGGGCTTTTCTTTCTTTATCCCAAAATCAGCATCAGT 2760
 yIleSer

GTCCAGAAGAGATCCTGCAACACTGCCACCTGCATGACCCATCGGCTGGTGGGCTTGCTC 2820
 ValGlnLysArgSerCysAsnThrAlaThrCysMetThrHisArgLeuValGlyLeuLeu

AGCAGATCTGGGAGCATGGTGGAGGCAACCTGTTGCCACCAAGATGGGCTTCAAAGTC 2880
 SerArgSerGlySerMetValArgSerAsnLeuLeuProThrLysMetGlyPheLysVal

TTTGGTGGGCGCCGAGGAATTTTGGATCTGAGCAGTGGGATGATTCAGGAGGAAGGT 2940
 PheGlyGlyArgArgArgAsnPheTrpIle***

GACTGCCCTTTTGTACCTTCGGGTGGGAGGACAGGACTGGGTATTGACGGGGTGCAAT 3000
 TCCACCCCTAACCTCTGTGAGCGCATGGGGTAAACCTCCACATGGCAAGGTGCCCA 3060
 CACCACTGTCTGGAGAAAGGACTGATAATCCCTATAACTGAAACATTGGGCTCTTCTCT 3120
 CTGTTTCTCCAGTCTCTCCCTGTGACACTGACATCATCTGCCAGGAAATATAGACCTGT 3180
 TTACTTAAACACACTGTTCCCTGGGTATTAAATGGGGTCCAGCTCTAGCATTAGAATTTGA 3240
 AAGGTAAATGACCTTACCTTTTGGAGCATACTTACAATGTTATGAACCTTGGAGCATAGA 3300
 CTGGATTCAAATACCTGTGTCTGTCTTCCACTAACTGTGACCATAGGCAAGTATGCCCT 3360
 GAGCCTCAGCTTCTCTTGTAACTTGAAGGCAACATAGTATCCTCAATATAAAATTTAA 3420
 TTAGTATAACATATGACAAGGCTGTAACTAAGAATTAATAACATTTCTTTACTTTT 3480
 TCCCTCTAGGTTACTTACTGCTGACTCTGAACTCTACTTCTTTAATTTACAATGAAAGCA 3540
 TACTAAAAATAGCATGGAAGACATCCATGATGATGCTTCTGGAACTGAAACACTC 3600
 TTTTCTCTGAAATAAATCAAATAAATGCAAAATAAATCAATCAATGCAATGCAATGCA 3660
 CTGTGTGCAATCTTTTGTGTATATGATCTTATAATATGATGATGCTCATTAGGTTTAA 3720
 TGGTAGCAAAATCTGGCCCTGTGAGCAACCTGTTGGTGGGGGAGCTCTGCTAAACCTC 3780
 AGGGTCACATGAATTC 3796


【図 18】

GGATCCACTAGTTCTAGATAAAATGGACAAATACCTAGAAACAGAAGACCTACCAAGATG 60
GAAGGATGAAGAAATAGAAAATTCAAATACACCTATGACTAGGAAGGAGAATGAAGCAT 120
AATCCAAAATCTTCCAACAAAGAAAAGCCCTGGATACGATGGCCTCATTTGGTGAATAGTA 180
CCAGACATTTAAAGAAAACGAATACCAATCCTTTGTCAAACCTTTTCCAAAACCTGAAGAG 240
AAAGGACACACCCTAACCTATTCTATGAGGCAGGCCAACATTACTCTGATACCAAAGATG 300
GAGAAAAGATTCTGCAAGGAGAAAACCCCTACAGACAAAATCCTTTATGACATGGATGTGG 360
AAACCCTCAACAGTATGCTAGGGAATTGAATTCAGAAGCGTATTTAAAGGATCCTACAAC 420
ATGACCAAGTGGGATGAATTTCTGGAATGCAAGGATGATTCAAAATATGAAAATTGATCA 480
AAGTGTATATACAAATAATGGAATGTAGGGAACACACCTGATTATTTCCACTGATA 540
CAGAAAATTATTTAGTAAAAATCAATACCTTTTTCAGGATTAAAAACAAAACCTAGGTATA 600
GAAGGAGACTGCCTCAGCACAAATACAACCTATATATGAAAAACCAACACCAACACCATAAT 660
CCAGGGTGGAAAACCTGAAAGCTTTTCCCTAAGATCTGGAAGAAAATGGAAAAAAATTTT 720
TAAGAATTTTCAGACAGATTTGGGTCTCTGGTACACTCTGAGAAATCATCTTTTAGAATT 780
TTTTTTTTTTTAAAAATAAGCACAGAATTTTCATTTAAAGAAGGGAAATAACATAGCCTT 840
CAGAGTTTATCAGGAGGTGTAATTTTTTTTTTTTCCACACTAGATTGTGGCTACCTGATGCTA 900
ATTTTGAGGTTTAAACATAATGAAATAAGATTGTACAGCCAAGTGCCAGCTAGTCATGGA 960
ACTTTTACCTCAGTACTGTTTAGTGCTTCAGTCCTAAGAAGTTTCAGGGAGGGCTGCGTG 1020
CAATACAAGTAATCGGTACTTGTCTGAAGGTCTAAAATTTTCGAGTGCACCTTGGTAAATCAG 1080
GGATGGGCGCAGAGGAGACTGGTTCTGTAACTCAGACTAGTGAACCTAGAAATTTAGAAA 1140
GGGTACTTTTGTGCTCCAAGCAAATCCTGTTCTACCTAAGTGGTCCAAATGCTCTGCAG 1200
GCTGTAGTTAGAGCCCTCTCATAGCAGGGAGACTGCCTTGGTGAATCTGCCAGAGGAAAT 1260
GAATTTCCATTTCACATTTCATTCAACAAACATTGGGCGAGTGCCACCTCATGTGCAAAACA 1320
TGGTGCCTAAGTGCTAAAGAAAAGATGTTGTTTTGTAAACTTACCCGCAGCTCAGAGCCAG 1380
GACTTCTTGGAAAGTCAGAGGACTTGAGGAAGGAGTTTCATCTCAGCCCCCTCCCTCACTGG 1440
AGAGACTGGCTTTTCTTTCCAAGTAAAGCTTAAACACTGCTGGAGGCTAAGTTAGCACCTT 1500
CTGGGGGCGAGACCCTGATTCCTGCCCTCATCCAGCCCTTTGTGTGTGGGCGCCAAAG 1560
ATTTCTGAGTGAGGAATGAATGTTGGCTTTGAAACAGGAAAGGCACAAGTGGCAGCCAAGG 1620
GTAGAATGCTGAGCCTACAAATTAACATAGTTACAAATTTGTCTTCTAAAGGAGTCGTTT 1680
CTTAGCCATAGTGACGCCACCTTTTGCATTGATCAAAACTGTGGTTCTTCCAATGAAAAAA 1740
GACATCCCAGACACACATACCTTACAAATGATTTTCAGAAAGATTGATAGGTTCGGAATCTC 1800
AGGTTTTTGGATTTTATTTGCAAAAGCGTTTTCGCCCTGAGTTTTTAAACTTTTTTTTTTTT 1860
TTTTTTTTTTTTGTATTTTTCACCTTCTAGGGCGGCTTCGGCGGCATATGAAATTCCTCAG 1920
GCTAGGGGTCTAATAGGCGCCATAGCCACCGGCTACGCCAGAGCTACTGCAACGCTGGA 1980
TCCGAGCCGCATCTGCAACCTACACCACAACCTCAGGCAATGCCGGATCGTTAACCCT 2040
GAGCAAGGCCAGGGATCGAACCCTGCAACCTCATGGTTCTTACTCAGATTTCGTTAACCCT 2100
GCGCCACGACGGCCACTCCAACCTACAGACTCTTAATTAAGTAGCAGAGTCCAATTTAC 2160
ATGCCGCACCATCTGTTTACCCGAGTTAGCGAATCTGGTCTTGGAACTAACTCCTCAC 2220
GGAAAGCCAAAGCCGAGTACTATAATTAATAGTGTGAACCCCAACCTGGTCTGGCCT 2280
GTGCACCCAATTTTGTCTGTAGTAGAAACCAGGATTTACGGAGCCCCGAGCAGTCCGCCA 2340
TCCTGAACTCTTCTCTTCTTCTACCTTGCTTCATCTGGAGTGCACCTGCCCTCTATGAA 2400
CCAGTTTTCCTGTTCCCTTGGTCTCCCGATCCGTTGTCTATCTGAGGAGAGCGAGATGC 2460
AAGCACCCGATTCCCTAGCCCCAATATTTTATCTCTTTCGGAAGGAGAAAAGTTGAATAA 2520
GGGTATCTTGTAAATGAGATGTTCCGAGTCCAGAGAGCACAAACCGGCAAGGGGAACAGA 2580
TGTGCCGCGAGGCAGGTGTGCGGAAAGATATAGAGAAGGCTCAGGTTCCGACCTGTGGCT 2640
CAGGTCACACTCATGGCAGAGTTCCGTTTAAATTTCCGCTCTGCCTGGGGGAACCACTTAA 2700
CTGGGGTCCCTTGCTGCCCTCCACCGGCCCGGATGCTGTTGCAGCGTTTGCCGCGCTGGA 2760
GGGTCTGTACAGGCTGCTGCGGTTTATCGCTGTGTGCTCAGACACGGTGATCCTGAGCAG 2820
CATCCGAACCTGGATTGGGGTAGATGTGGGCACAGGGCTGGAATCACAGGTCACCTGGAACA 2880
TCTTGGCAAACAGCAGCCGGAAGCAAGGGGCAGCTGGGCAAATGGTTCTGGGACATTGAT 2940
GGGCTTAGATGATGAATGGTGGGGCTGGAGGTCCGCTTGGCGGCTTGGGAAGCATCTATG 3000
CCGTGCACGTCCTTCCCCAAGCCAGTAGGGCACCATCTTCCCCATATGGTGGACCGAC 3060
CAGCCAGCGGACTCCAGACATCCGCACAGAGGTGGGGATTGGGCAAATGGATCGCGATC 3120
GCACAGAATCCCTCTGCACCTTCCCTGGTAAAGCTCTTCTCGATCCCTCCCTGGGTGGAGA 3180
GCAGGTACATGGCTACTAATGATACCACTCCTTGAAGACGGGAATATGATGCCCCGTTC 3240
AAAAATTAATATATTGAGGTGCTAGAAGACACTAGCCCGATGATCTTACTACCTAGAAAA 3300
GGCACAGCTGGAACAAAGTTTCCGTGTGACAAAGACTGTGATCCTGCCTCTTGTTCCTCA 3360
CAAATCCTGCCTTCTGTGCTTGATTCCAGTGCCTGAATCAGACCCCTGCTTGGGCAC 3420
AGAATCATCAACCTGCTGCGCATTAACCTCCCAACCGCACTTGGACATGGTAGTCTTAG 3480
GGGACCGGGGATGCTTGTAAAGCTGGACTCTGCTCTACAAAGATCACATAGCTGGGGAT 3540
GGAGAGGGATGTGAGCCTGCGAAACCGAAGAGTAAAGTTTACCATGACGTCAAACCTGTC 3600
CTTAAATTCCTGCTCACTTTGCGTGTGTTTTTCGTTGGTGCCACCAACCTCCCCACCCC 3660
CTCCACCCCCCGCATCAATGACCTCAATGCAATACAAAGTGGGGTGGTCTGTTGGATG 3720
CTCCAGGTTCTGGACGCAAGTAGTACACAATCTGGGGCTCAGGATCTTTCCTCTCAT 3780
GGTTGCCTGGAGCTCTGGGACCAACCCAGATTTCAGAGCGGCGGAATAAGAGCAGCTGCT 3840


【図19】

GGTGGCGGGAAGGAGGTAGAGGCCACTACCCACCTCAAGTGTCTCTGCCGCTTCTTCCACAG	3900
TGCCATGCGCTGACGCCAACGCTGCTGCCTCTGCTCCCTCCTCTGTGCTCCAGTCCACCTGG	3960
TTCTCTGCTGCCCGGTAAAGCCCGAGAGTTCCCTGCTAAGCTGTGGTTCTGTCTCTCTCC	4020
TCTCTCTCCCTTCCCTCTCTCTCTCCATTTGATTTTCTTAGCTGATCTCTTTTCCCGTCTCAA	4080
AGTTCTCTGTCACCTTCTCTCTGCGTCTCTTCATCTCTGTAAATATGCTTACTGCGCAATTC	4140
ATTCTAGGCTCCCTTTACAGAGTTAACTCTGGATGCTCTCAGTTCTCGGGGATTCCTCTGCTCTA	4200
CTCTTCTGAGCTGAGCTGGGCTCCAGTCTTGTCTCCCGCAGCAGACGCTGCTTAGGTTCCGT	4260
GTTGGGATTTTGGAGCTCTCCAGGCACCTTCAGGGAGAGGAGGATGCGAATAGCTTTTGA	4320
GCAGAGAAATCTTTATGATGATCCCATCTCTCTTCTTACCTAAGCATCGCTGGAATAGGG	4380
TGGGAGCTCGGACAGTGCAAAATGGGTGGCAAAATAGGTGCAATGACTGAGGGGAAAGTAG	4440
CTATTAAACGCAAGCCCAAGTTGAAGGTTCTGGGAACTCCCTCCCTCCGACCCGCCACCC	4500
ATTTAATCTTGGGCTCCCAATTTAAGGCTGTACCGGCTGTGTTTCTTACAGGCTGCTCTTTG	4560
CCAGATGATGGAGCAGCTGGACAGTAAATTTTGGTTCTTCAGTTCTTCAGGAGTTCCAAC	4620
TGCAGAGATATGCTCTCCCAACTCCCTTCCCTCCGACCCAGGTATAAGCAAAATCAGGC	4680
ATCAGGAGAGATGCTGATGGGTTGCACATATGGGAAAGCTGTGGTGACAGGTAAGTGTGAG	4740
TCTGTCTCCAGGAGTCCCGGCCAACAGGTTGAAGTGTGAGAGTGTGGGTGTCTGGGCG	4800
GGGGCTATGGACGGGACACTTCTCACCCAGTTGTCTCTGTAGGCTCTTTGTCTTAAACCAA	4860
GCATGTTGACGGCTCAGCTGATCTTCCAGCAGTCCACTTGGCTGAGGAGGAAATGATGTT	4920
GAAAGGAAAGGACAGCAGGAGCCCTGAAGCCAGGAGAGCGGGAGTTGGAGGCAGAGCGAC	4980
GACGACAGCCAGGCTGTCTGTGGCTCAATGAACTTGGAACTGCTACAGGTGGTGACATTTGT	5040
TCTTCCCTTGACAGAGGGGCACCATGGGCTTCTGGAATTTCCGCCCTTCTGTGTTCTCAG	5100
<i>MetGlyPheTrpIysPheProProPheLeuValLeuSe</i>	
CATCCTGGTCTGTACACGGCAGGCATGTTCCACACAGCACCCGTGAGGTAAGACAGCAC	5160
<i>riLeuValLeuTyrGlnAlaGlyMetPheHisThrAlaProValAr</i>	
TGTGTCAGTGTCTCTCGCTTCCCAAGGGCCCTCCGATATATAGTCTGTATTGTGAGTT	5220
GTGCTGTGGTGACTCTGGCTTCTGGTGGGCTTCTGTATAGGGGTTGGGGTCCCTAAT	5280
TGTGAATATAGTCATGTATATAAGTTTATTATAAATATTTTGTGATCCAAGATAATATC	5340
ACAAAGTTTACAAATAAATAGAAATATACAGTATTCACATAAAATTTCTAAACTCAGTC	5400
AACCTTACAGCATGTTTGTGTTGCTTTTATGAAATGTTTATAACTTTAGCAACCTATA	5460
TAGTAATTTAGCCATAATTTAGCAATATGAATTCATCTAAATTAAGTAAATTTGTCAATAT	5520
AATTTGTTTAAATCTGAAAGGTAATCTATACAATTTCTCACCTCTTTCAAATTAAT	5580
AATATGAAACCAATTTTCAATTTCAAACATATCATTTAATTTTAAATATGCTGTATTTAA	5640
CACTAAGCTCATACAATTTCTGAAGATCTAAACCATCAGCTTTCAAAGGCTCAATGATGC	5700
ACTTTCAGCAGAACTACTTTGTGGACACCCAGAGCTTAATCTAGGTGAGCAGCATTT	5760
TTGGATGAACACTAGCCATATGTCTGACCGTTTGAAGATTTATCATGACCTTATTTCTCAGA	5820
GGAGTGTGGCAGAAACCCAGGAATCTCGGCTGCTTATGCAATGGGCTGTGGTAGGCTCAGAGC	5880
GCATTTGGGCTTGTCTTTCCCTTCCCATGATGTCCTTTGGAGAGCAGCTTTGATTCTGCCA	5940
<i>gLeuProLeuGluSerSerPheAspSerAlaT</i>	
CTCTCACAGAGGAGGAAGTGTCCCTTCTACTGGTTGCAATGTTGAAGGATTTATGTGCAGA	6000
<i>hrLeuThrGluGluGluValSerLeuLeuLeuValAlaMetValLysAspTyrValGlnH</i>	
TGAAGGCCACTGTCTGGAGCAGGAGTACAGAGGACTTCAGCTCAGCTTTTGACCCCTCC	6060
<i>etLysAlaThrValLeuGluGlnGluSerGluAspPheSe</i>	
CAGAAATATGGCTTACCCTCTCCCTAGAGTACCAGGAAGGCATATCCTTAAAGAAATGAGATT	6120
TGTTATAGTGCCTAAGCCCTGATGTCCAGTCTCATAAGCCTTGGTTTATTTTTAGTTTAT	6180
CTTACAGGAGAGATGTCTATTATACAGTCTGATTTTCCAGGTCCAGATGATGACAGCCAC	6240
TTTTGGGTTTCTGACACCCCTGACAAATGCTATGAGGAGTGATGATGATTTTCCCAA	6300
AGCCCTATGTTTCTGTTTGGGATTTTGTGTTTAGCAGAAACATTCAGGTTACATGCTG	6360
CCTCTCAGAGCTGTAATTTTCCACATGATGTTGCTAGCTCTGGGGGGAATCACTTGCCTCAA	6420
GCTGTCTATGGCAGCCCTTCTTGTCTCCATCCTGAAATCAGCATCACTGCCCAAGGA	6480
<i>riLeThrAlaGlnGl</i>	
GAAATCCTGCAACACTGCTAGCTGTGTGACCCACAAGATGACAGGCTGGCTGAGCAGATC	6540
<i>uLysSerCysAsnThrAlaSerCysValThrHisLysMetThrGlyTrpLeuSerArgSe</i>	
TGGGAGCGTGGCTAAGAACAACTTTCATGCCACCACCAATGTGGACTCCAAATCTTGGGGCT	6600
<i>rgLysValAlaLysAsnAsnPheMetProThrAsnValAspSerLysIleLeuGly**</i>	
ACGCCGACAGAGCCCTCAGGCTTGAGCTGTGAAATGACTCCACAAGAGGTGACTGCTC	6660
<i>*</i>	
TAGAACATGGGATAGCAGGGCAAATGGCTGGGTATTTTCAGGGGTGTGGCTCAACTCTAA	6720
CCCTCCCTGAGAGGCTGACTGTAAATAAAATCCATAATGAAGTGTGCTACCCCATTAAC	6780
CTCAGAAAGAAAGATGATCTTAATAGCCAAAACCCCTATAACTTAGGTTCACTTCTATT	6840
TTTTCCAGTGTCTCCAGTGACTCTGAGGTCACTGTGCAGGAATAATAGATCTTATCTT	6900
TTTTCTTCTTCTTTTGGCTACCCCAAGGCATGTGTGGCAACTGTGGCCAGGGATGAAAT	6960
CTGAACCATAGCTGTGACCTATGACGATACCTGTGGCAACACTGGATCCTTAACCCAATG	7020
ACCACATCAGGAACCTCTAGGTCCTATTTATTAACCACTGTTTCCCTGAGTTATAATGT	7080
TGATTTCTTAGTTTGTGAGTTTGAAGGATTAATGATCTTCCAGTGAGTTTGAAGTATA	7140
ACTACAATGTCACATATATCTGAATTCAGAGCACTTGATCTGAGTTTCAAGTTCGATGTCTG	7200
CTTTCCTCACTTAACATACAAACCTGGGCCAGACCCCTCTGCACTGAGCTCTCACTGAAA	7260
CTTTAAGGCAACAATAATATTACCTGTATCATTAATATAAAAGTAACTGAGATAAT	7320
CATGGTAAGAGCTCACTAATTAATAAGTAATAATATCTAGCTCTTATTTTTCTCTCC	7380
TAGGTCACCAAGGAACCTGAATCTTCTTCTTTTAACTGCAATGAAAGCAATTTATTGA	7440
AAAATGAGCATGGAAAACACACATATATGCATGCTTCTGTCTGAAATACAGCTTTTAGCT	7500
TGAATATAACTAAACTAAATGCAGATAAAATCATTTGACGACTACTGATATGATCAT	7560
TTAATATTGATCTGTATCTTATTAAGTATGACTCATGCTCTGCTGGCTTATCTGGTAGC	7620
AAATCTGGACCCCTGTACGCAACCTGTTGGTGGTGGCAGCTCTGCTAAACCTC	7680


【図 20】

CTCAAGTGTCTCTGCCGCTTCTTCCACAGTGCCATCGCCTGACGCCAACGCTGCTGCCTC	-52
TGCTCCCTCCTCTGCTCCAGTCCACCTGGTTCTCTGCTGCCCGAGGGGCACCATGGGCTTC	9
M G F	3
TGGAAATTTCCGCCCTTCTGTTCTCAGCATCCTGGTCTGTACCAGGCAGGCATGTTT	69
W K F P P F L V L S I L V L Y Q A G M F	23
CACACAGCACCCGTGAGATTGCCTTTGGAGAGCAGCTTTGATTCTGCCACTCTCACAGAG	129
H T A P V R L P L E S S F D S A T L T E	43
GAGGAAGTGTCCCTTCTACTGGTTGCAATGGTGAAGGATTATGTGCAGATGAAGGCCACT	189
E E V S L L L V A M V K D Y V Q M K A T	63
GTGCTGGAGCAGGAGTTCAGAGGACTTCAGCATCACTGCCCAGGAGAAATCCTGCAACACT	249
V L E Q E S E D F S I T A Q E K <u>S C N T</u>	83
GCTAGCTGTGTGACCCACAAGATGACAGGCTGGCTGAGCAGATCTGGGAGCGTGGCTAAG	309
<u>A S C V T H K M T G W L S R S G S V A K</u>	103
AACAACATTCATGCCACCAATGTGGACTCCAAAATCTTGGGCTGACGCCGCAGAGAGCCT	369
N N F M P T N V D S K I L 	117
CAGGCCTGAGCTGTGAAATGACTCCACAAAGAAGGTCACCAAGGAACTGAACTCTATTTC	429
TTTTAATCTGCAATGAAAGCAATTTATTTGAAAAATAGCATGGAAAACACACATATATGC	489
ATGCTTCTTGCTTGAAATACAGCTTTTAGCTTGAAATAAACTAAACTAAATGCAGAATA	549
AAATCATTCAGCTACCTGAAAAAAAAA	579

【図 21】

GCCCAGCTTACGTCTCCTTTCTCCGCCAGTGCCATCACCTGCCACCAGCGCGGTTGTTGC	-52
TTCTCCCACTTGGGCTCCAAGCTACCTGGTTCTGTCATCCAGAGGGGCACCATGGGCTTC	9
	M G F 3
TGGAAGTTCCCCCCTTCCTGATCCTCAGCATCCTGGTCCTGTACCAAGCAGGAATGCTC	69
W K F P P F L I L S I L V L Y Q A G M L	23
CATGCCGCGCCATTTCAGGATGGCTTTGGGAAGCAGCTTTGATTCTGCCACACTCACGGAA	129
H A A P F R M A L G S S F D S A T L T E	43
GAGGAAATGTCCCTCCTACTGGTTGCAATGGTGAAGGATTATGTGCAGATGAAGGCCACT	189
E E M S L L L V A M V K D Y V Q M K A T	63
GTGCTGGAGCAGGAGACAGAGGACTTCAGCATCACCCAGGAGAGATCCTGCAACACT	249
V L E Q E T E D F S I T T Q E R <u>S C N T</u>	83
GCCATCTGTGTGACCCACAAGATGGCAGGCTGGCTGAGCAGATCTGGGAGCGTGGTTAAG	309
<u>A I C V T H K M A G W L S R S G S V V K</u>	103
AACAACCTTCATGCCCATCAACATGGGCTCCAAAGTCTTGGGCCGCGCGCAGACAGCCT	369
<u>N N F M P I N M G S K V L</u>  R R R R Q P	123
CAGGCCTGAGCTGTGAAATGACTCTAAAAAGAAGTTGAACTCAAGTTGCTTTCACTGCAA	429
Q A *	125
AGTTGCTTTCCCTGCAAAATTAAAAGAACCAATTTGAAAAATAGCATGGAAGACACACATA	489
TATGCATGCTTCTTGCTTGAAATACAACCTTTTGCTTGAAACAACTAAACCTAAATGCA	549
GAATAAAATCATTGCAGTTACCTGA	574

【図 22】

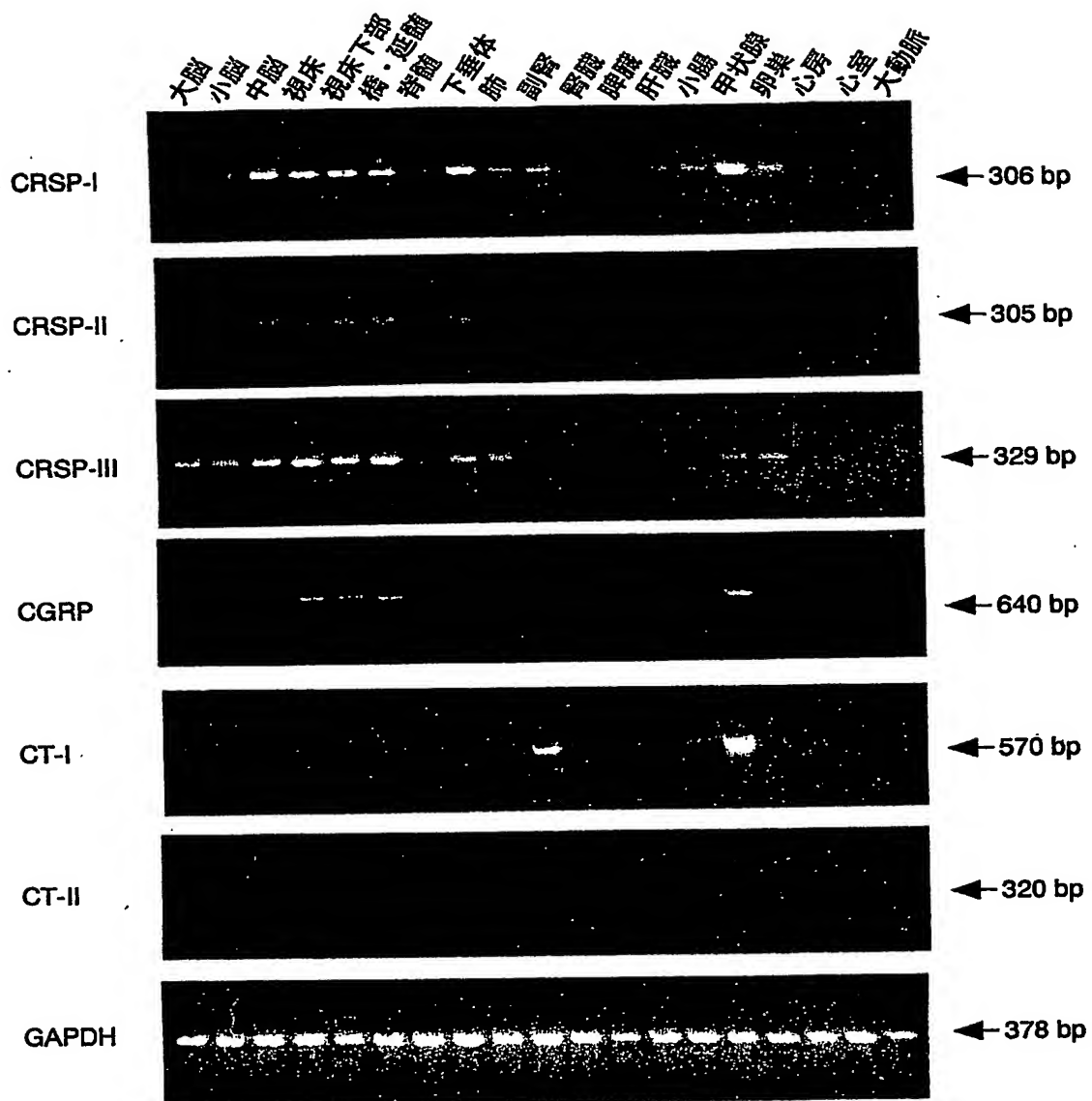
GCCCAGCTTACGTCTCCTTTCTCCGCCAGTGCCATCACCTGCCACCAGCGCGGTGTGTGC	-52
TTCTCCCACTTGGGCTCCAAGCTACCTGGTTCCTGCATCCAGAGGGGCACCATGGGCTTC	9
	M G F 3
TGGAAGTTCCCCCCTTCCTGATCCTCAGCATCCTGGTCCTGTACCAAGCAGGAATGCTC	69
W K F P P F L I L S I L V L Y Q A G M L	23
CATGCCGCGCCATTTCAGGATGGCTTTGGGAAGCAGCTTTGATTCTGCCACACTCACGGAA	129
H A A P F R M A L G S S F D S A T L T E	43
GAGGAAATGTCCCTCCTACTGGTTGCAATGGTGAAGGATTATGTGCAGATGAAGGCCACT	189
E E M S L L L V A M V K D Y V Q M K A T	63
GTGCTGGAGCAGGAGACAGAGGACTTCAGCCTGGACAGCTCCAGAGCTAAGCAGTGCAAT	249
V L E Q E T E D F S L D S S R A K <u>Q C N</u>	83
AATCTGAGTACCTGTGTGCTGGGAACATATACATGGGACGTCAACAAGTTTTATGCATTC	309
<u>N L S T C V L G T Y T W D V N K F Y A F</u>	103
CCCTTAACTACAACCTGGGATTAGAGTATCTGGCAAGAAATGGGTCAGGGCCAGAGTCTCA	369
<u>P L T T T G I R V S</u>  K K W V R A R V S	123
GAGAAAGTCCATTATCCCTCAAGGCAGCATACCCTAAGGTGCTTAAGAAGGCCCCCACCC	429
E K V H Y P S R Q H T L R C L R R P P P	143
CTCCTCCTTTCTAGTTCTCTCCTAGAATTTGCATGTGTCTTCTCTCTGGTTGCTCTCTGA	489
L L L S S S S P R I C M C S S L V A L	162
GCTGCTATCAGCAGCTTTCCCTTGTGGCCATGGATGTCTGGAATATCAGAGAGGAGGTGGG	549
GGGTGGGGGCAGGCAGGCCAGAAGAAAATCACTCAGGAATAGATTAGGAGAGAAATGGGCA	609
GCCCTGTGAGTGCCTGTGGATTTCACAGCAGAGCTTCTCAGTCCTGCTTCTGAACATGCT	669
TTTCACTAGGGAATAAAAGTAT	691

【 2 3 】

PCRSP-2
 PCRSP-3
 PCRSP
 PCGRP
 pAM
 SCNTASCVTTHKMTGWLSRSGSVAKNNFMP-TNVDISKIL-NH₂
 SCNTAICVTHKMAAGWLSRSGSVKNNFMP-INMGSKVL-NH₂
 SCNTATCMTHRLVGLSRSGSMVRSNLLP-TKMGFKVFG-NH₂
 SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGMVKSNEVP-TDVGSEAF-NH₂
 YRQSMNMFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDGVAPRSKISPQGY-NH₂

pCT
 pCT-2
 CSNLSTCVLSAYWRNLNNFHRESGMGFCPETP-NH₂
 pECNNLSTCVLGTYTWDVVKFYAFPLTTTGIRVS-NH₂

【図 24】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、中枢神経系に発現し、カルシトニン受容体に作用する新規かつ有用な蛋白質、その遺伝子、及びそれを含有してなる医薬組成物を提供する。

【解決手段】 本発明は、次の（１）～（６）の性質、（１）中枢神経系において発現し、（２）カルシトニン受容体に強く作用し、（３）細胞の cAMP 産生能を促進させ、（４）ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む作用を有し、（５）カルシウムイオンの取り込みを抑制し、（６）細胞増殖を抑制する作用を有するペプチドに関する。より具体的には、配列表の配列番号 1、配列番号 2、配列番号 6、配列番号 9、配列番号 12、配列番号 16、若しくは配列番号 19 で示されるアミノ酸配列、又はこれらのアミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加を受けたアミノ酸配列を有する前記のペプチドに関する。また、本発明は、これらのペプチドをコードする遺伝子、及びそれを含有してなる医薬組成物に関する。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日	1998年 2月24日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名	科学技術振興事業団

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591108880]

1. 変更年月日 1991年 5月24日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府吹田市藤白台5丁目7番1号

氏 名 国立循環器病センター総長

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.